

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Zdeněk Vytlačil

**Přínos denisovanů a neandertálců pro variabilitu recentních populací
člověka**

Denisovan and Neanderthal Contribution to Variability of Recent Human Populations

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jaroslav Brůžek, CSc., Ph.D.

Konzultantka: RNDr. Pavlína Čejková, Ph.D.

Praha 2014

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Jaroslavu Brůžkovi, CSc., Ph.D. a RNDr. Pavlíně Čejkové, Ph.D. za poskytnutí relevantní literatury, věcné připomínky a cenné rady, které výraznou měrou přispěly k napsání této práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 14. 5. 2014



Podpis

Abstrakt

Mísili se anatomicky moderní lidé s dalšími homininy během svého rozšíření z Afriky? Až donedávna zůstávala odpověď na tuto otázku skrytá. Studie archaické mitochondriální DNA nedokázala podat důkazy, které by tento problém dokázaly podpořit anebo vyvrátit. Naštěstí nedávné objevy dobře zachovalé jaderné DNA neandertálců, jakož i nově popsanych denisovanů, ukázaly, že současní obyvatelé Eurasie nesou ve svém genomu stopy archaické DNA. Tato práce shrnuje známá paleogenetická data zabývající se tímto problémem a dává příklady genů ovlivněných mísením.

Klíčová slova: mísení, paleogenetika, neandertálci, denisované, variabilita moderních lidí, archaická DNA

Abstract:

Did anatomically modern humans admix with other hominins during their range expansion from Africa? Until recently, the answer to this question remained elusive. Studies of archaic mitochondrial DNA failed to provide evidence in either direction. Fortunately, recent discoveries of well-preserved nuclear DNA of neanderthals, as well as newly described denisovans, have shown that recent Eurasians carry traces of archaic DNA in their genome. This thesis summarises known paleogenetic data addressing this problem and gives examples of genes affected by admixture.

Keywords: admixture, paleogenetics, neanderthals, denisovans, modern human variability, archaic DNA

Obsah:

1. Úvod	1
2. Paleogenetika	2
2.1 Problémy provázející práci s archaickou DNA	2
3. Neandertálci	4
3.1 Genetika neandertálců	5
3.1.1 Mitochondriální DNA neandertálců	5
3.1.2 Jaderná DNA neandertálců	8
4. Denisované	13
4.1 Místo nálezu – Jeskyně Denisova	13
4.2 Nalezené ostatky denisovanů	13
4.3 Vzájemná příbuznost denisovanů a dalších homininů	14
4.3.1 Genetická analýza jedince ze Sima de los Huesos	15
4.4 Přibližný areál rozšíření denisovanů	16
5. Archaická DNA v genomu moderního člověka	17
5.1 Podíl neandertálské DNA v genomu moderních lidí	17
5.2 Podíl denisovanské DNA v genomu moderních lidí	17
5.3 Vzájemné mísení archaických homininů	18
5.4 Otisk mísení v konkrétních genech	19
5.4.1 Gen <i>STAT2</i>	19
5.4.2 Skupina genů <i>OAS</i>	20
5.4.3 Katabolismus lipidů	20
5.4.4 Komplex <i>HLA</i>	21
5.4.5 Gen <i>DMD</i>	22
5.4.6 Gen <i>MCPHI</i>	23
5.4.7 H2 haplotyp	24
6. Diskuse	25
7. Závěr	27
8. Přílohy	28
9. Použitá literatura	30

1. Úvod

Se vznikem anatomicky moderního člověka před přibližně 200 000 lety a jeho rozšířením po světě téměř jistě došlo v některých oblastech ke kontaktu s jinými, dosud přežívajícími, skupinami homininů. Obzvláště v případě neandertálců, kteří z archeologického záznamu mizí krátce po příchodu moderních lidí do Evropy, se dlouho ve vzduchu vznášela otázka, jaké povahy mohly být tyto mezidruhové interakce a jestli mohly tyto dvě skupiny plodit společné potomky. Až s rozvojem metod studia DNA z fosilního materiálu se začala vynořovat šance na zodpovězení této otázky. Nové techniky umožňují získat archaickou DNA ze stále staršího fosilního materiálu a vyhledat její stopy v recentních populacích člověka, což může dát odpověď nejen na to, zda k mísení došlo či ne, ale též identifikovat geny získané od jiných homininů, které se stále drží v populacích anatomicky moderních lidí, poskytnout informace o homininech nezjistitelné z kosterního materiálu a dokonce též přispět k pochopení vzniku anatomicky moderního člověka a směru a způsobu jeho migrací.

Cílem této práce je zjistit jak přispělo studium paleogenetiky k pochopení vztahů anatomicky moderního člověka a dalších homininů, převážně *Homo neanderthalensis* a nově objevené skupiny označované jako „denisované“ (Reich et al., 2010). Největší prostor je věnován způsobu, jakým tento obor pomohl k objasnění otázky mezidruhového křížení těchto skupin a případnému zisku genů a jejich alel, dosud se vyskytujících v recentních populacích člověka.

2. Paleogenetika

Průběh studia DNA z fosilního materiálu by se dal stručně shrnout do několika základních bodů. Extrakce DNA z ostatků, její chemická úprava a stanovení míry kontaminace, odstranění kontaminovaného materiálu ze vzorku, amplifikace, sekvenace a konečné zpracování výsledků - například porovnání s jinými sekvencemi (Green et al., 2010; Krause et al., 2010; Reich et al., 2010).

Nejčastěji studovaný materiál získaný z fosilních vzorků představuje mitochondriální DNA (mtDNA). To je způsobeno především tím, že se v buňce nachází ve větším počtu kopií, což zvyšuje pravděpodobnost jejího dochování ve stavu stále umožňujícím analýzu (Hofreiter et al., 2001 b; Pääbo et al., 2004). Tato DNA však není ke studiu nejvhodnější, neboť se dědí pouze maternálně a neprobíhá zde rekombinace, což způsobí, že snadněji podléhá vlivům selekce, genetického driftu a genového toku (Reich et al., 2010). Závěry odvozené z tohoto materiálu mohou být tedy značně zkreslené a nemusí přesně odpovídat genetické historii zkoumaného jedince nebo populace. Z tohoto hlediska je mnohem vhodnějším ke studiu jaderný genom, který může dodat úplnější a přesnější údaje. Zároveň dokáže poskytnout další informace o životě homininů identifikováním specifických genů, čímž získáme informace, které nejsou patrné z morfologie kostí ani sekvence mtDNA (Green et al., 2010; Reich et al., 2010; Prüfer et al., 2014). Nicméně jaderný genom se v buňce nenachází v tak hojném počtu jako mtDNA a je náchylnější k tomu, aby byl ovlivněn procesy popsány dále.

2.1 Problémy provázející práci s archaickou DNA

Studium DNA z fosilního materiálu se musí potýkat jak s řadou problémů značně znesnadňujících používané postupy, tak i jevů, které mohou výrazně zkreslit výsledky analýz. Prvním problémem je samotný stav archaické DNA. Po smrti organismu dochází k degradaci nukleových kyselin působením buněčných enzymů a mikroorganismů. Dále je DNA ovlivněna chemickými procesy zahrnující deaminaci, depurinaci, fragmentaci řetězce, oxidativní poškození a další, jež způsobí její poškození. DNA se tudíž může dochovat ve fosilním materiálu za fyziologických podmínek jen omezenou dobu v řádech desítek tisíc let, a když k tomu dojde, jedná se o velice krátké fragmenty. Aby se genetický materiál dochoval déle, musí být ostatky uchovány za příhodných podmínek, jakými jsou například nízká teplota, sucho a rychlá degradace měkkých tkání krátce po úmrtí živočicha (Pääbo, 1989; Lindahl, 1993; Hofreiter et al., 2001 b).

Druhý problém představuje kontaminace vzorku cizorodou DNA. Ten je obzvláště nepříjemný, neboť může stát za falešně pozitivními výsledky analýzy. Kontaminace bývá většinou způsobena mikroorganismy a často dosahuje vysokých hodnot, například ve studii jaderného genomu neandertálců, kterou provedli Richard E. Green et al., 2010, 95 až 99 % DNA extrahované ze vzorků bylo kontaminací (Green et al., 2010). Mnohem větší problém, hlavně v případě studia homininů, však představuje kontaminace vzorku genetickým materiálem moderních lidí, jejíž nepříjemnost spočívá v tom, že z důvodu blízké příbuznosti může být velice obtížné odlišit od sebe původní a exogenní DNA (Pääbo et al., 2004; Green et al., 2009). Ke kontaminaci může dojít při samotných vykopávkách manipulací s ostatky anebo následnou prací v laboratoři. K minimalizaci pravděpodobnosti kontaminace by měla extrakce a analýza probíhat ve sterilní místnosti s použitím důkladně ošetřených nástrojů, pracovníci by měli mít oděv zabraňující přenosu DNA (rukavice, jednorázový plášť, obličejový kryt) a jednotlivé kroky pracovních postupů by měly být od sebe odděleny (Handt et al., 1996). Naštěstí existují molekulárně biologické metody umožňující odhalit míru kontaminace. Například u ženských ostatků lze tuto hodnotu odhadnout pomocí sekvencí typických pro Y chromozóm (Green et al., 2009).

Další problém představují chyby při sekvenaci DNA. Během amplifikace pomocí metody PCR může dojít k řadě chyb vedoucích k zařazení chybných bází a tím pádem k vzniku sekvence neodpovídající skutečnosti. Tyto substituce mohou být způsobeny jak poškozením templátové DNA, příkladem budiž poměrně častá přítomnost deaminovaného cytosinu vedoucí k záměně CG páru za AT ve finálním produktu, tak chybovostí *Taq* DNA polymerázy. K omezení pravděpodobnosti chyby při určování genetické sekvence těmito jevy by měla být amplifikace provedena s využitím několika stovek templátových molekul DNA, jsou-li k dispozici. Pokud je materiálu ze vzorku příliš málo, měly by proběhnout alespoň dvě na sobě nezávislé amplifikace a sekvenace (Hofreiter et al., 2001 a; Pääbo et al., 2004).

Nové technologie a postupy dokázaly pomoci při překonávání těchto problémů a otevřely dveře výzkumu archaických genomů. Například metoda přípravy DNA knihoven z jednovláknové DNA (Meyer et al., 2012), která dokáže nejen zdvojnásobit množství archaické DNA pro replikaci (podle slov autorů se to obejde bez nutnosti purifikačních kroků), ale i začlenit do knihovny molekuly s poškozením na jednom vlákně (Meyer et al., 2012). Díky tomu byli vědci schopni získat jadernou DNA s vysokým pokrytím (Meyer et al., 2012; Prüfer et al., 2014) a kvalitní data i z ostatků starých 400 000 let (Meyer et al., 2014).

3. Neandertálci

Pod pojmem neandertálci se rozumí skupina homininů blízce příbuzná anatomicky moderním lidem, jejíž oblast výskytu pokrývala převážně Evropu a sahala až do oblastí jižní Sibíře (Krause et al., 2007 b; Prüfer et al., 2014). *Homo neanderthalensis* má oproti anatomicky modernímu člověku výrazně odlišnou kosterní morfologii a je historicky spojován s mousteriénskou kamennou industrií (Hrdlička, 1927). První popsáný nález byl učiněn při těžbě vápence roku 1856 v jeskyni Feldhofer v údolí Neander poblíž Düsseldorfu a nese označení Neanderthal 1 (Feldhofer 1) (Fuhlrott, 1859; cit. podle Schmitz et al., 2002). Podle této kostry byla pojmenována celá skupina a tento nález položil základy paleoantropologie. Když se v nedávné době vědci na tuto lokalitu vrátili a prozkoumali sedimenty z původních výkopů z 19. století, našli fragmenty, které anatomicky patří původnímu nálezu holotypu, a též prokázali přítomnost ostatků nejméně dvou dalších neandertálců, datovaných na dobu před cca 40 000 lety (Schmitz et al., 2002). Neandertálský člověk je nejbližším příbuzným našeho druhu a byl považován za jednu z fází vývoje moderních lidí (Hrdlička, 1927), což se nejspíše odráží v občasnému použití označení *Homo sapiens neanderthalensis*. V dnešní době jsou ale neandertálci většinou přijímáni jako sesterská skupina anatomicky moderních lidí (Hublin, 2009).

Nejmladší nálezy neandertálců v Evropě jsou staré asi 28 000 lety (Finlayson et al., 2006), což se překrývá s dobou migrací prvních skupin anatomicky moderního člověka do Evropy, jejichž jedny z nejstarších ostatků, prokazatelně náležících *Homo sapiens*, byly datovány na 34 až 36 tisíc let před současností (Trinkaus et al., 2003). Je velice pravděpodobné, že se tyto dvě skupiny setkaly. Jelikož neandertálci mizí z archeologického záznamu krátce po příchodu moderních lidí, vyvstává nám velice zajímavá otázka, jaké povahy tato potencionální setkání byla. Mohlo dojít k násilným střetům, jak snad naznačuje zranění neandertálce (Shanidar 3), způsobené nejspíše vrhnutým či vystřeleným projektilem (Churchill et al., 2009), avšak přesné okolnosti tohoto zranění, včetně identity případného útočníka, jsou obtížně zjištělné.

Mnohem zajímavější a lépe prokazatelná je možnost mísení neandertálců s anatomicky moderními lidmi. Řada kosterních nálezů prvních anatomicky moderních lidí v Evropě vykazuje určité neandertálské a ancestrální rysy, které by se daly považovat za důsledek tohoto mezidruhového kontaktu (Trinkaus, 2007). Asi nejvýznamnější archeologický důkaz pro mísení jsou pohřbené ostatky čtyřletého dítěte, nalezené v Abrigo do Lagar Velho v Portugalsku, staré 24 500 až 25 000 let, které by mohly patřit jedinci vzniklému hybridizací

neandertálců a anatomicky moderních lidí. Studie morfologie popsala toto dítě jako morfologickou mozaiku těchto dvou skupin homininů a navíc jako potomka početnější populace vzniklé mísením (Duarte et al., 1999). Nicméně proti těmto závěrům se objevily i výtky (Tattersall a Schwartz, 1999). Autoři tvrdí, že u některých znaků nelze dojít k definitivním závěrům z důvodu neukončeného vývoje tohoto jedince a dále, že žádné ze znaků nejsou jednoznačně neandertálského původu a mohou být pochopeny jako krajní hodnoty odpovídající varianční šíři anatomicky moderních lidí. Taktéž archeologický kontext kostry je bez jakýchkoliv náznaků neandertálského vlivu (Tattersall a Schwartz, 1999). Archeologie tedy nedokázala podat naprosto přesvědčivé důkazy o mísení a pro zodpovězení této otázky bylo třeba pomoci jiného oboru.

3.1 Genetika neandertálců

Analýza genetických sekvencí z archaického materiálu se, jak je popsáno dále, ukázala jako velice dobrý nástroj pro zkoumání vlastností a vztahů mezi homininy.

3.1.1 Mitochondriální DNA neandertálců

První studie byly zaměřeny na mitochondriální DNA. Analýza provedená na ostatcích z jeskyně Feldhofer v údolí Neander odhalila kompletní sekvenci hypervariabilního regionu I a ukázala, že mtDNA neandertálců nezapadá do varianční šíře mtDNA moderních lidí – liší se od ní průměrně $27,2 \pm 2,2$ substitucemi, což je třikrát více než můžeme pozorovat mezi jednotlivými liniemi mitochondriální DNA moderních lidí (Krings et al., 1997). Tyto linie se též od neandertálské liší všechny téměř stejným počtem substitucí, což znamená, že žádná z populací není neandertálcům příbuznější než ostatní. Dále tato studie zjistila, že k rozdělení mtDNA neandertálců od předků anatomicky moderních lidí došlo před 550 000 až 690 000 let, tedy dříve než k rozdělení jednotlivých linií moderních lidí. Z toho autoři usuzují, že se neandertálci s anatomicky moderními lidmi nemísili, i když připouštějí, že by k přenosu nějakých genů od neandertálců k moderním lidem dojít mohlo. To však považují, s přihlédnutím k morfologickým odlišnostem obou skupin, za nepravděpodobné (Krings et al., 1997).

Další sekvencí získanou z mtDNA neandertálců byla hypervariabilní oblast II, izolovaná opět z prvního nalezeného neandertálce v jeskyni Feldhofer. Tato sekvence byla společně s již známou hypervariabilní oblastí I porovnána s mtDNA moderních lidí a

potvrdila neandertálce jako sesterskou skupinu anatomicky moderních lidí, jejichž mitochondriální linie se rozdělily před 465 000 (317 000 – 741 000) lety, a nebyly nalezeny žádné důkazy svědčící o možnosti pozdějšího mísení (Krings et al., 1999).

Mitochondriální DNA byla získána i z dalších neandertálských ostatků, například asi 30 000 let starých kostí z kavkazské jeskyně Mezmaiskaya (Ovchinnikov et al., 2000), temenní kosti z Warendorf-Neuwarendorfu v Německu a klíční kosti nalezené v chorvatské Krapině (Scholz et al., 2000), dalších dvou Feldhoferských neandertálců z Německa (Schmitz et al., 2002), několika ostatků ze španělské jeskyně El Sidron (Lalueza-Fox et al., 2005, 2006), femuru z Les Roches-de-Villeneuve ve Francii (Beauval et al., 2005), neandertálce nalezeného na lokalitě Monti Lessini v Itálii (Caramelli et al., 2006) a zubu z belgické jeskyně Scladina (Orlando et al., 2006), avšak v těchto případech se jednalo o velice krátké zlomky, které nepřinesly žádné nové poznatky týkající se mísení.

Serre et al., 2004, ve své studii rozhodli využít již známé mitochondriální sekvence, specifické pro neandertálce a snadno odlišitelné, k otestování jejich přítomnosti v ostatcích 24 neandertálců a 40 archaických *H. sapiens*. Pokud by byly tyto neandertálské sekvence přítomny v ostatcích moderních lidí, potvrdily by mísení těchto dvou skupin homininů. Naneštěstí byl rozsah studie značně zmenšen na pouhé 4 neandertálce (Vi-77, Vi-80, Engis 2, La Chapelle-aux-Saints) a 5 anatomicky moderních lidí (Mladeč 2 a 25c, Cro-Magnon, Abri Pataud, La Madeleine), protože analýza aminokyselin naznačila, že ve většině ostatků se DNA nedochovala v dostatečné kvalitě a jak autoři píší ve svém článku, nepovažovali za ospravedlnitelné provést na těchto jedincích destruktivní odběr vzorků. Neandertálskou mtDNA se podařilo prokázat u všech čtyř neandertálských zástupců, ale u žádného z anatomicky moderních lidí. Z těchto údajů vyvozují závěr, že neexistují důkazy podporující významný přenos genů mezi těmito skupinami homininů. Maximální hodnoty mtDNA přenesené z neandertálců do anatomicky moderních lidí, odvozené ze závěrů jejich práce, jsou poměrně nízké a záleží na populačním modelu. Pokud by byla efektivní velikost populace *Homo sapiens* 10 000 jedinců, neandertálci nemohli do jejich genomu přispět více než 25 %. Nicméně dodávají, že k definitivnímu zamítnutí mísení mtDNA by bylo třeba prostudovat mnohem více pleistocénních ostatků anatomicky moderních lidí (Serre et al., 2004). Obdobně ani další práce provedená na hypervariabilní oblasti I mitochondriálního genomu dvou archaických *Homo sapiens* z jeskyně Paglicci v Itálii nenašla důkaz podporující mísení. Tyto DNA, staré 25 000 a 23 000 let, autoři porovnali s již osekvenovanými vzorky neandertálské mtDNA a databází recentních lidí. Pokud by k mísení došlo, je větší šance najít důkazy o této

události v genetickém materiálu chronologicky bližším neandertálcům než je materiál současných lidí. Ukázalo se, že vzorky zapadají do variační šíře pozorované u anatomicky moderního člověka, lišící se od referenční sekvence průměrně v 2,34 substitucích (1 v případě druhého vzorku). Naproti tomu, vůči neandertálským vzorkům vykazovaly mnohem vyšší rozdíl – 22 až 28 substitucí, což naznačuje, že obě skupiny homininů jsou si poměrně vzdálené a neandertálci nepřispěli do genetické výbavy recentních lidí. Avšak je třeba zmínit varování autorů, že i přes důsledné preventivní opatření a kontroly provedené v této studii nelze s naprostou jistotou vyloučit možnost kontaminace vzorků moderní DNA a tudíž není možné tento důkaz brát jako naprosto správný a neomylný (Caramelli et al., 2003).

Znalost sekvencí neandertálské mtDNA též pomohla k identifikování ostatků z jeskyní Teshik-Tash v Uzbekistánu a Okladnikov na Sibiři jako neandertálských. Porovnání genetického materiálu z těchto nálezů s evropskými neandertálci odhalilo výraznou shodu a substituce v hypervariabilní oblasti I odpovídající známému polymorfismu u těchto homininů. Podobnost s evropskými zástupci naznačuje, že do střední Asie neandertálci migrovali poměrně nedávno a rozšiřuje oblast jejich výskytu až do oblasti Sibíře (Krause et al., 2007 b).

Neandertálci z chorvatské jeskyně Vindija se opět dostali do popředí v roce 2008, kdy se podařilo z kosti Vi33.16 (Vi-80) pomocí nových technologií sekvenování a znalosti dříve identifikovaných částí mtDNA typických pro neandertálce izolovat a sekvenovat kompletní mitochondriální genom neandertálců (Green et al., 2008). Jedná o pozoruhodný technologický výkon, který kromě zpřesnění doby divergence mtDNA neandertálců a anatomicky moderního člověka na 660 000 (520 000 až 800 000) let před současností, což odpovídá předchozím odhadům, poskytl náhled i na poměrně nedávné změny v mitochondriálním genomu moderních lidí a hlavně na genetickou historii neandertálců. Zdá se, že jejich efektivní populace byla mnohem menší než v případě anatomicky moderních lidí, nejspíše kvůli opakujícím se etapám zalednění (Green et al., 2008). Kompletní mitochondriální genom byl následně získán i z pěti dalších neandertálců – Feldhofer 1 (Neanderthal 1) a Feldhofer 2 z Německa, kosti Vi33.25 nalezené v Chorvatsku a jedinců z jeskyní El Sidron ve Španělsku a Mezmaiskaya v Rusku (Briggs et al., 2009). Neandertálci podle těchto dat vykazují velice nízkou diversitu mtDNA, o 37 % menší než je u dnešních Evropanů a pouze třetinovou v porovnání s celosvětovou populací recentních lidí, svědčící o jejich malé efektivní populaci, která mohla odhadem obsahovat méně než 3500 žen. Zdá se, že tato malá populace nebyla jen záležitostí posledních pár desítek tisíc let, ale jednalo se spíše o dlouhodobější jev. Poměr

nesynonymních mutací vůči synonymním v mtDNA je u neandertálců dvakrát vyšší než u lidí a šimpanzů a svědčí o rychlejší evoluci proteinů, což může být důsledek právě malé populace během dlouhého časového úseku (Briggs et al., 2009).

Mitochondriální DNA může přispět také k pochopení chování neandertálců. Porovnání sekvencí mezi 12 jedinci z jeskyně El Sidron naznačilo, že u těchto homininů by se mohl vyskytovat patrilokální reprodukční systém, neboť všichni tři dospělí muži v této jeskyni náleželi k jedné ze tří mitochondriálních linií, svědčící o jejich vzájemné příbuznosti, kdežto každá ze tří dospělých žen náležela k jiné (Lalueza-Fox et al., 2011). Zbýlých šest neandertálců bylo nedospělými jedinci a autoři použili jejich věk a příslušnost k mitochondriální linii k velmi spekulativnímu odhadu délky reprodukčního intervalu neandertálců na 3 roky (Lalueza-Fox et al., 2011). Avšak toto ani kompletní mitochondriální genom nepřinesly nové definitivní důkazy podporující či odporující možnosti mísení s anatomicky moderními lidmi.

3.1.2 Jaderná DNA neandertálců

Ač důkazy získané z mitochondriální DNA možnosti mísení anatomicky moderních lidí s neandertálcem během jejich migrace do Evropy příliš nenasvědčují, nejedná se o důkazy přímo a jasně tuto možnost zamítající. Je třeba připomenout, že mitochondriální DNA snadněji podléhá genetickému driftu, selekci a dalším vlivům, které mohou výslednou podobu značně zkreslit. To znamená, že i kdyby k případnému přenosu genetického materiálu došlo, je mnohem méně pravděpodobné, že budou tyto přenesené úseky přítomné i v recentních populacích. Proto by bylo vhodnější prostudovat neandertálský jaderný genom, který by mohl vydat jednoznačnější data. S rozvojem technologií se skutečně podařilo izolovat, sekvenovat a následně i analyzovat jaderný genom neandertálského člověka.

První střípky neandertálského jaderného genomu byly získány z kosti Vi-80 (Vi33.16) nalezené v jeskyni Vindija v Chorvatsku a publikované ve dvou nezávislých článcích (Noonan et al., 2006; Green et al., 2006). Ani jednomu z týmů se nepodařilo získat kompletní sekvenci a museli si vystačit jen s krátkými úseky, i tak se však podařilo dojít k nějakým závěrům a hlavně dokázat, že získat jadernou DNA je díky novým postupům a technologiím možné. Noonan et al. zjistili, že míra endogenní DNA ve vzorku dosahuje 98 %, přiřadili neandertálské sekvence k odpovídajícím lidským (počet přiřazených sekvencí pozitivně koreloval s délkou chromozómu a rozdělení těchto sekvencí naznačovalo, že se jedná

o reprezentativní vzorek celého neandertálského genomu) a porovnali jednonukleotidové polymorfismy v těchto odpovídajících sekvencích u neandertálců, moderních lidí a šimpanzů. Z výsledků stanovili dobu, kdy se začaly v ancestrální populaci oddělovat neandertálské a moderní lidské genetické linie, na 706 000 (468 000 – 1 015 000) let před současností. Porovnáním neandertálských sekvencí s mapou genetické diversity moderních lidí založené na jednonukleotidových polymorfismech (HapMap) určili dobu oddělení populací neandertálců a lidí na přibližně 370 000 let před dneškem (odhady se pro jednotlivé populace poněkud odlišovaly). Tři pozice neandertálského genomu obsahovaly odvozené alely, ale žádná neodpovídala evropským a vypracované statistické modely zavrhlly možnost mísení mezi neandertálci a moderními lidmi. Avšak bylo pracováno jen s krátkými sekvencemi a ne s kompletní jadernou DNA neandertálců, což i přes to, že tyto zkoumané sekvence představovaly reprezentativní vzorek genomu, mohlo vést k chybě. Studie též naznačila, že až 99,5 % neandertálského genomu by mohlo být shodných s DNA moderních lidí (Noonan et al., 2006). Druhá studie, kterou provedl Green se svými kolegy, probíhala velice obdobně, ale za použití odlišného postupu zpracování DNA, který vedl k mnohem větší výtěžnosti (Green et al., 2006). Navíc provedli analýzu mtDNA pro potvrzení, že se skutečně jedná o ostatky neandertálce. Nicméně závěry odvozené z jaderné DNA se od předchozí studie poněkud lišily. Čas začátku rozdělení genetických sekvencí neandertálců a předků anatomicky moderních lidí stanovili na dobu před 465 000 až 569 000 lety. Tento interval se překrývá s průměrnou dobou divergence alel u lidí, též stanovené v této práci (před 419 000 – 498 000 lety). Po porovnání jednonukleotidových polymorfismů zjistili, že neandertálský vzorek obsahuje asi 30 % odvozených alel, které jsou též poměrně časté u recentních lidí. Považují to za důkaz genetického toku mezi neandertálci a anatomicky moderními lidmi (Green et al., 2006). I když obě práce byly provedeny na stejné kosti, došly k odlišným závěrům, což je přinejmenším zvláštní. Wall a Kim, 2007, se rozhodli obě práce zkontrolovat. Znovu analyzovali data ze vzorků použitých v předchozích studiích. Doby divergence genetických sekvencí byly srovnatelné s původními pracemi, pouze s malými odchylkami způsobenými použitými metodami. Oddělení populací neandertálců a předků moderních lidí však vyšlo velice odlišně. Pro data, se kterými pracovali Noonan et al., vyšlo 325 000 let a pro data z práce Greena et al. pouhých 35 000 let (v této práci nebyla tahle hodnota spočítána). Veliký rozdíl byl též ve stanovení míry mísení. Tato hodnota záleží na době rozdělení populací, a pokud se stanoví jako 325 000 let, pro první soubor dat vyjde 0% (Noonan et al.) a pro druhý 94% (Green et al.). Srovnají se, pouze pokud by k oddělení došlo před 60 000 lety a později. Jelikož data z druhé práce (Green et al.) neodpovídají ani důkazům získaným

archeologií a z mtDNA, podrobili tento soubor dalšímu testování. Rozdělili získané sekvence podle velikosti a pro každou skupinu spočítali dobu rozchodu neandertálských a lidských sekvencí. Krátké fragmenty odpovídaly závěrům práce od Noonana et al., kdežto dlouhé fragmenty naznačovaly, že by k tomu došlo v době, kdy se už začaly odlišovat jednotlivé populace moderních lidí. Stejně tak procentuální zastoupení odvozených alel odpovídá DNA moderních lidí více než neandertálské. Z těchto důvodů naznačují, že tento vzorek mohl být kontaminován moderní DNA. Míra divergence neandertálské DNA však u obou prací vychází stejně, což by v případě kontaminace nemělo. Proto pouze tvrdí, že v některé ze studií (pravděpodobně Green et al.) je chyba způsobená buď kontaminací nebo chybami v sekvenaci (Wall a Kim, 2007). To, že byl vzorek, na kterém pracoval Green et al. kontaminován moderní DNA, bylo následně potvrzeno (Green et al., 2009). Tyto první dvě studie jaderného genomu neandertálců tedy nedokázaly přinést definitivní odpověď na otázku, zda došlo k mísení anatomicky moderních lidí s neandertálci. Jsou poněkud smutnou připomínkou problémů provázejících studium archaického genetického materiálu a zároveň představují významný technologický pokrok a úspěch v tomto oboru.

Po těchto prvních studiích následovalo několik prací analyzujících krátké úseky genů neandertálců. I když nepřinesly žádné informace o mísení, zaslouží si být zmíněny, protože odhalily jisté vlastnosti neandertálců nezjistitelné z kosterního materiálu. Z neandertálských ostatků z lokality Monti Lessini se povedlo izolovat krátký fragment genu *MC1R* s nesynonymní mutací, odlišující ho od sekvencí moderních lidí. Stejná mutace byla nalezena též ve vzorku El Sidron 1252. Tato mutace ovlivňuje cytoplazmatickou část melanokortinového receptoru 1 (MC1R), vedoucí k jeho snížené funkci (Lalueza-Fox et al., 2007). U moderních lidí změny funkce tohoto proteinu vedou ke vzniku ryšavosti a světlé kůže (Flanagan et al., 2000) a lze předpokládat, že podobný efekt mohl mít i u neandertálců. Neandertálci byli též schopni vnímat hořkou chuť, jak ukázal genetický materiál ze vzorku El Sidron 1253. Nekompletní sekvence genu *TAS2R38* pokryla část kódující jednu ze tří důležitých aminokyselin receptorového proteinu potřebného pro vnímání hořkosti a ukázala, že tento neandertálec měl alelu důležitou pro rozeznání této chuti (Lalueza-Fox et al., 2009). Ostatky z jeskyně El Sidron podaly též svědectví o přítomnosti genu *FOXP2*, spojovaného s vývojem řeči, v identické podobě u moderních lidí i neandertálců. I když jedno z možných vysvětlení této shody je genový tok od moderních lidí k neandertálcům, Krause et al. ho nepovažují za příliš pravděpodobný (Krause et al., 2007 a).

Opravdový průlom nastal roku 2010, kdy byl publikován kompletní neandertálský jaderný genom, složený dohromady z materiálu tří jedinců (Green et al., 2010). Vzorky byly získány z ostatků nalezených v chorvatské jeskyni Vindija, Vi33.16 (Vi-80), Vi33.25 a Vi33.26. Všechny tři kosti náležely odlišným ženám, ale Vi33.16 a Vi33.26 byly s největší pravděpodobností příbuzné. Bylo sekvenováno 5 recentních lidí (afričtí zástupci etnik San a Yoruba, čínský Han, Francouz a asijský Papuánek) pro porovnání jejich a neandertálské divergence oproti referenčnímu lidskému genomu, která se v případě neandertálce ukázala mnohem větší. Neandertálský genom byl dále využit pro identifikaci 78 substitucí v genech kódujících proteiny v genomu moderních lidí, odlišných od lidoopů i neandertálců a tím pádem unikátních pro náš druh, a oblastí genomu, jež mohly u anatomicky moderních lidí podléhat pozitivní selekci, například gen *RUNX2*, který by mohl být zodpovědný za odlišnou morfologii neandertálců a moderních lidí. Pomocí sekvence izolované z jedince afrického etnika Yoruba byla stanovena doba rozdělení populací neandertálců a předků anatomicky moderních lidí na období mezi 270 000 a 440 000 lety před současností. Dále byly porovnány bialelické jednonukleotidové polymorfismy mezi neandertálci, dvěma Američany evropského původu, dvěma východoasijskými lidmi a čtyřmi Západoafričany. Zkoumalo se, zda se neandertálské alely shodují s alelami dvou *Homo sapiens* stejně často. Tento test byl proveden v několika různých kombinacích moderních lidí a ukázalo se, že neandertálci mají shodné množství společných alel s Evropany a Asiaty, ale mnohem méně společných alel s Afričany. To se potvrdilo i zopakováním testu s původním souborem pěti recentních lidí, který ukázal shodné výsledky. Kontaminace na to vliv mít nemohla, protože by musela být víc než desetkrát větší, než bylo prokázáno ve vzorku, a když se provede tento test pro každou z neandertálských kostí zvlášť, výsledky budou srovnatelné. Je vysoce nepravděpodobné, že by u tří vzorků došlo ke stejné kontaminaci. A v neposlední řadě možnost znečištění materiálu a zkreslení závěrů vyloučilo porovnání jednotlivých moderních lidí mezi sebou. Nejlepším vysvětlením pro výraznou podobnost neandertálců s určitými recentními populacemi *Homo sapiens* je genový tok od neandertálců k předkům moderních lidí žijících mimo Afriku, což je důkaz podporující mísení anatomicky moderních lidí s neandertálci (Green et al., 2010). Během skládání neandertálského genomu z Vindijských jedinců byly získány sekvence jaderné DNA i ze tří dalších neandertálců z lokalit El Sidron ve Španělsku, Feldhofer v Německu a Mezmaiskaya v Rusku. Tyto vzorky byly krátké a nepokryly kompletní neandertálský genom (Green et al., 2010). Znalost jaderných sekvencí vedla k zjištění, že neandertálci prodělali během doby své existence výrazný pokles velikosti

populace (Reich et al., 2010). To odpovídá obdobným závěrům získaným z mtDNA (Briggs et al., 2009).

V altajské jeskyni Denisova byl objeven proximální falang nohy, morfologicky stejně blízký neandertálcům (Shanidar-4) i anatomicky moderním lidem (Tianyuan) (Mednikova, 2011). Z falangu byl získán kompletní jaderný genom v kvalitě mnohem vyšší než v případě první sekvence z Vindijských jedinců. Pomocí této DNA se podařilo přiřadit ostatek k neandertálcům a zjistit o tomto jedinci několik zajímavých informací. Prst náležel neandertálské ženě, jejíž rodiče byli blízce příbuzní - buď nevlastní sourozenci se společnou matkou, bratranec a sestřenice ze dvou sourozeneckých párů (double first cousin), teta (strýc) a synovec (neteř) anebo prarodič a vnouče. I tento genom potvrdil malou velikost populace neandertálců a s tím související nízkou heterozygotitu (Prüfer et al., 2014).

4. Denisované

Rozvoj studia DNA v archeologickém materiálu vedl k překvapivému a naprosto nečekanému nálezu. Jen díky důkazům získaným paleogenetikou byl v jedné sibiřské jeskyni nalezen pravděpodobně nový druh hominina.

4.1 Místo nálezu - Jeskyně Denisova

Jeskyně Denisova se nachází v severozápadní části pohoří Altaj na Sibiři, na pravém břehu řeky Anuj v přibližné výšce 30 metrů nad hladinou. Jedná se o významnou archeologickou lokalitu rozkládající se na celkové ploše 270 m², která poskytla mnoho artefaktů datovaných od středního paleolitu až po pozdní středověk (Derevianko et al., 2008). Vrstva 11 v jeskyni Denisova byla velice bohatá na nálezy typické pro industrii svrchního paleolitu, zahrnující nástroje a dekorační předměty, jako je například kamenný náramek (Derevianko et al., 2008). Tato vrstva poskytla i dostatečné množství biologického materiálu vhodného k datování pomocí radiokarbonové metody. Výsledky ukázaly, že se ve vrstvě 11 nachází dvě skupiny nálezů. Jedna starší než 50 000 let a druhá spadající do rozmezí přibližně před 30 000 – 16 000 lety (Derevianko et al., 2008; Reich et al., 2010).

4.2 Nalezené ostatky denisovanů

Ve vrstvě 11 v jeskyni Denisova byly nalezeny též lidské ostatky. Jednalo se o levý, pravděpodobně třetí molár, nalezený roku 2000, a distální falang ruky, objevený roku 2008 (Reich et al., 2010).

Falang měl zachovalý povrch proximálního kloubu a patrnou nesrostlou epifyzární linii. Na základě těchto morfologických dat bylo odhadnuto, že prst náležel dítěti ve věku 6 až 7 let (Reich et al., 2010). Falang je pozoruhodný především neobvykle vysokou mírou zachované DNA a nízkou kontaminací cizorodým genetickým materiálem (Meyer et al., 2012), což je příhodné, protože studium genetického materiálu může odhalit některé poznatky, jež by běžným negenetickým studiem zůstaly skryty. Analýza ukázala, že prst náležel osobě ženského pohlaví, neboť bylo nalezeno jen zanedbatelné množství sekvencí typických pro Y chromozóm (Reich et al., 2010), a byly též identifikovány alely typické pro tmavou kůži a hnědé vlasy a oči (Meyer et al., 2012).

Zub patrně patřil dospělému jedinci a vykazoval řadu znaků neodpovídajících varianční šíři třetích molárů neandertálců a anatomicky moderních lidí. Svou velikostí, krátkými rozbíhajícími se kořeny a dalšími morfologickými charakteristikami má blíže k zubům archaičtějších zástupců rodu *Homo* (Reich et al., 2010). Genetický materiál zubu prokázal, že se jedná o další osobu ze stejné populace, jako byl původní majitel prstu. Tato populace byla podle místa nálezu pojmenována „denisované“ (Reich et al., 2010).

Existuje i zmínka o objevení třetího ostatku, zubu, náležejícího denisovanům, nicméně žádné další informace nebyly zatím publikovány (Gibbons, 2011).

4.3 Vzájemná příbuznost denisovanů a dalších homininů

S netypickou morfologií falangu vyvstává otázka, zda náležel jedinci nového druhu anebo zda se jedná o pouhou variaci vyskytnuvší se v populaci neandertálců či anatomicky moderních lidí v Altajských horách. První náhled na tento problém přinesla analýza mitochondriální DNA, která byla porovnána s mtDNA 54 vzorků recentních lidí, 6 neandertálců, zástupcem pozdně pleistocénního člověka, jednoho šimpanze učenlivého a šimpanze bonobo. Porovnání počtu rozdílných nukleotidů v těchto vzorcích ukázalo, že denisovanská mtDNA má těchto odlišných pozic téměř dvakrát více než neandertálská v porovnání s materiálem recentních lidí. Pokud by byly ostatky nalezené v jeskyni Denisova neandertálské, tento rozdíl by měl být menší. Výsledky tedy naznačují, že se jedná o příslušníky jiného druhu (Krause et al., 2010). Stejní autoři odhadli dobu divergence mtDNA neandertálců, denisovanů a anatomicky moderních lidí na dobu před 779 300 až 1 313 500 lety (Krause et al., 2010).

Další informace o vztazích fosilního nálezu falangu z jeskyně Denisova s ostatními homininy přinesla analýza jaderného genomu, který se ve falangu dochoval v nebývalé kvalitě. Míra dochované endogenní jaderné DNA je až 70 %, což je neobvykle mnoho (Meyer et al., 2012).

K testování, zda jsou denisované jiným druhem, byl zvolen postup, kdy bylo zjištěno, jestli denisovanský jedinec má ve svém genomu oblasti lišící se u moderních lidí a šimpanze. Poměr obsahu šimpanzích a lidských částí genomu přibližně odpovídal poměru zjištěnému u neandertálců. To svědčí o tom, že denisované se od společného předka oddělili přibližně ve stejné době jako neandertálci a mohou pocházet se stejné ancestrální populace oddělené od předků anatomicky moderních lidí. Toto bylo potvrzeno porovnáním jednonukleotidových

polymorfismů v odpovídajících si částech DNA těchto tří skupin homininů a ukázalo se, že denisované a neandertálci si jsou vzájemně bližší než s moderními lidmi. U denisovanů však nebyl prokázán podobný úbytek velikosti populace jako v případě neandertálců a srovnání počtu substitucí purinových a pyrimidinových bází přítomných v jaderném genomu odhalilo, že mezi jednotlivými neandertálci je mnohonásobně více společných jednonukleotidových záměn než mezi denisovanským jedincem a neandertálci, což vypovídá o odlišné genetické historii těchto dvou skupin. To Reich et al., 2010, považují za dostatečný důkaz pro tvrzení, že ostatky nalezené v jeskyni Denisova nejsou neandertálské, ale patří zástupci jiné sesterské skupiny (viz Obr. 1 v Přílohách). Ve své práci určili dobu oddělení jejich DNA sekvence od neandertálské na období před 640 000 lety a od anatomicky moderních lidí na 804 000 let (Reich et al., 2010). V další studii bylo oddělení denisovanů od anatomicky moderních lidí zpřesněno na rozdělení genetických sekvencí přibližně před 800 000 lety a vznik samostatných populací spadající do rozmezí před 700 000 až 170 000 lety (Meyer et al., 2012).

Rozdíl mezi daty z mitochondriální a jaderné DNA a z nich vyvozených závěrů je markantní. Reich se svými spolupracovníky ve své práci nabízejí dvě možná vysvětlení. Buď bylo setrvání starší mtDNA v denisovanech způsobeno vlivem genetického driftu anebo ji získali po oddělení své evoluční větve mísením s jinou archaičtější skupinou, která nebyla zatím identifikována (Reich et al., 2010).

4.3.1 Genetická analýza jedince ze Sima de los Huesos

Zdá se, že též nálezy z jeskyně Sima de los Huesos, Sierra de Atapuerca v severním Španělsku, mají co říct k postavení denisovanů vůči ostatním homininům. Kostí nalezené na této lokalitě jsou starší než 350 000 let (Bischoff et al., 2003) a mohou zde ležet až 600 tisíc let (Bischoff et al., 2007). Existují diskuse, zda nálezy z této archeologické lokality náleží zástupcům *Homo heidelbergensis* a nebo *Homo neanderthalensis* (Stringer, 2012). Analýza mitochondriální DNA femuru z této jeskyně ukázala výraznou podobnost s mtDNA denisovanů a zdá se pravděpodobným, že obě populace vznikly ze společného předka a homininé ze Sima de los Huesos jsou si s denisovany bližší než s neandertálci či anatomicky moderními lidmi. Podle získaných dat by k rozdělení vývojové větve denisovanů a jedinců ze Sima de los Huesos mělo dojít před 700 tisíci lety (v rozmezí před 400 000 až 1 060 000 lety). Stáří femuru bylo odhadnuto na 400 000 let (150 000 – 640 000) (Meyer et al., 2014). Toto je však v rozporu s morfologickými údaji. Kupříkladu byla publikovaná studie, jež

porovnála zuby nalezené v Sima de los Huesos, jejichž počet v roce 2007 činil 533 kusů, se vzorky zubů zástupců dalších homininů. Výsledky této komparativní analýzy ukázaly, že zuby mají velice mnoho znaků běžných u neandertálců a celkově vykazují značnou podobnost s touto skupinou (Martín-Torres et al., 2012). Též studie spánkových kostí odhalila, že homininé ze Sima de los Huesos mají jisté znaky přítomné i u neandertálců (Martínez a Arsuaga, 1997). To nesouhlasí se značně archaickými rysy moláru z jeskyně Denisova (Reich et al., 2010). Meyer se spolupracovníky navrhuje několik možných vysvětlení. Člověk ze Sima de los Huesos by mohl být příbuzným předků denisovanů, což však nevysvětluje jejich archaické znaky. Také je pravděpodobné, že doba kdy žil jedinec, jemuž patří studovaný femur, předchází době rozdělení denisovanů a neandertálců. Druhou možností je, že homininé ze Sima de los Huesos představují skupinu vzdálenou od denisovanů i neandertálců. Dalším vysvětlením může být, že tito jedinci náležejí k populaci předků moderních homininů. V poslední řadě by těmto faktům odpovídal i model, kdy jiná archaická skupina přinesla tuto mtDNA do populací denisovanů a lidí ze Sima de los Huesos (Meyer et al., 2014).

4.4 Přibližný areál rozšíření denisovanů

Je třeba zmínit, že ač nálezy kosterního materiálu denisovanů jsou omezeny pouze na jednu archeologickou lokalitu (Reich et al., 2010), genetické studie by mohly přiblížit i jejich areál rozšíření. Přítomnost denisovanského genetického odkazu v recentních obyvatelích Malajsie a naopak jeho absence v genomu kontinentálních Asiatů (bude probráno dále) naznačuje, že k jejich vzájemnému mísení muselo dojít někde v jihovýchodní Asii (Reich et al., 2011). Existuje i názor, že k této výměně genetického materiálu došlo východně od Wallaceovy linie (Cooper a Stringer, 2013). To by znamenalo, že denisované obývali rozsáhlé území od jižní Sibíře až po tropické oblasti jihovýchodní Asie. Jsou-li homininé ze Sima de los Huesos blízcí příbuzní jejich předků, areál rozšíření by mohl sahát až do západní Evropy a překrývat se s oblastí výskytu neandertálců. Toto však je pouhá domněnka, neboť vztah těchto dvou skupin je značně nejasný (Meyer et al., 2014).

5. Archaická DNA v genomu moderního člověka

5.1 Podíl neandertálské DNA v genomu moderních lidí

První kompletní sekvence neandertálského genomu nepřinesla pouze důkazy pro mísení anatomicky moderních lidí s touto skupinou homininů, ale umožnila též stanovit přibližné množství archaické DNA přítomné v recentních populacích. Pokud k mísení došlo před 50 000 až 80 000 lety, neandertálského dědictví bude v genomu recentních mimoafrických populací rovno 1 až 4 % (Green et al., 2010). S tím se shoduje i novější stanovení této hodnoty na $2,5 \pm 0,6$ %, provedeném s využitím dat získaných z jedince z jeskyně Denisova (Reich et al., 2010). Mnohem kvalitnější jaderná sekvence altajského neandertálce v kombinaci se sekvencemi neandertálců z jeskyní Vindija a Mezmaiskaya nakonec vedla ke zpřesnění této hodnoty na 1,5 – 2,1 % (Prüfer et al., 2014). Také se ukazuje, že neandertálská DNA v moderních lidech je podobnější kavkazskému neandertálci z jeskyně Mezmaiskaya než ostatním dosud sekvenovaným neandertálcům (Prüfer et al., 2014), což s faktem, že neandertálské sekvence najdeme u většiny euroasijských populací, naznačuje, že k tomuto mísení došlo někde v oblasti Středního východu (Green et al., 2010).

5.2 Podíl denisovanské DNA v genomu moderních lidí

Jaderná DNA denisovanů též vydala svědectví o jejich mísení s moderními lidmi nezávisle na neandertálcích. Jsou mnohem méně příbuzní dnešním Evropanům a Asiatům v porovnání s neandertálci a nebyli tedy součástí populace, která se mísila s předky dnešních euroasijských populací. Avšak v případě obyvatele vysočin Nové Guiney a ostrova Bougainville byla zjištěna značná shoda s denisovany a Reich et al. stanovili, že $4,8 \pm 0,5$ % genomu recentních Melanésanů pochází od této archaické skupiny (Reich et al., 2010). To prokazuje další intimní kontakt anatomicky moderních lidí s hominidy. Toto zjištění vyústilo v rozsáhlejší studii genetických vztahů v populacích Asie a Oceánie. Analýza a statistické porovnání jednonukleotidových polymorfismů v 33 populacích recentních lidí z této oblasti ukázaly, že archaická DNA se nachází nejen u Papuánců, ale i australských Aboriginců, filipínského kmene Mamanwa a u dalších skupin z ostrovů Fiji, Polynésie a východní Indonésie. U Austrálců byl tento genetický materiál odhalen ve výši lehce převyšující Papuánce (Reich et al., 2011). Tato studie poskytuje zajímavý náhled na způsob osídlení jihovýchodní Asie a populační dynamiku anatomicky moderních lidí. Data ukazují, že s největší pravděpodobností došlo k mísení denisovanů s předky dnešních Aboriginců,

Papuánců a Filipínců, a následnému nepřímému rozšíření archaické DNA do dalších populací. Nápadná je absence denisovanského genetického materiálu v populacích obývajících kontinentální Asii a západní Indonésii, naznačující dvě migrační vlny moderních lidí do této oblasti (Reich et al., 2011). Pro lepší představu viz ilustrace Obr. 2. Nedávná studie (Prüfer et al., 2014) naznačila možnost, že denisované přispěli i do genofondu pevninských Asiatů a domorodých Američanů (Karitiana, Mixe) v míře přibližně 0,2 %, což by ale mohl být důsledek genového toku z populací anatomicky moderních lidí, mísících se s denisovany.

5.3 Vzájemné mísení archaických homininů

Nová data ukazují, že nedošlo jen k mísení anatomicky moderních lidí s neandertálci a denisovany, ale též k mísení těchto homininů mezi sebou. Prüfer et al. identifikovali vyšší heterozygotitu u denisovanů v oblastech genomu blízce příbuzných neandertálským, svědčících o tom, že minimálně 0,5 % jejich genomu bylo získáno od neandertálců a to pravděpodobně v oblasti Sibíře, protože tyto sekvence jsou podobnější nedávno sekvenovanému altajskému neandertálci (Prüfer et al., 2014).

Také se zdá, že se denisované mísili s další dosud neidentifikovanou skupinou homininů a mají ve svém genomu 0,5 - 8 % její DNA. Dnešní Afričané mají více společných odvozených alel s neandertálci než s denisovany. To je překvapivé, neboť anatomicky moderní lidé se v Africe objevili až poté, co odtud odešli předci těchto skupin homininů. Nejlepším vysvětlením pro tento jev je právě mísení denisovanů s další, mnohem archaičtější populací homininů, která se oddělila od ostatních homininů před 0,9 až 4 miliony let. Jak zmiňují Prüfer et al. ve své práci (Prüfer et al., 2014), dalo by se to též vysvětlit složitým modelem populační historie a struktury, ale s přihlédnutím k faktu, že u denisovanů se nachází archaičtější mtDNA (Krause et al., 2010) než by odpovídalo jejich jadernému genomu (Reich et al., 2010), a že tuto mitochondriální DNA nalézáme i u homininů ze Sima de los Huesos (Meyer et al., 2014), zdá se možnost mísení s tímto neznámým homininem realističtější. Autoři též navrhují jako kandidáta na tohoto záhadného hominina druh *Homo erectus* (Prüfer et al., 2014). V příloze je uvedeno grafické znázornění genového toku mezi populacemi homininů, viz Obr. 3.

5.4 Otisk mísení v konkrétních genech

Procentuální zastoupení archaické DNA v populacích recentních lidí je jistě zajímavou informací a může poskytnout důležitý náhled do vztahů mezi homininy a naší minulostí. Nicméně od hominidních „bratrů a sester“ jsme nedostali jen spoustu nicneříkající nekódující DNA, ale též nové alelické formy genů, které jsou stále zastoupeny v recentních populacích anatomicky moderního člověka a aktivně transkribovány. Tyto geny mohly v minulosti (a dost možná i dnes) přinášet našim předkům evoluční výhodu. Také je naopak možné, že některé z nich by mohly být spojeny s nemocemi trápícími dnešní světové populace. Zdá se, že studium těchto archaických genů a jejich forem je v poslední době na vzestupu, dále proto uvedu ty studie a geny, které se mi podařilo dohledat.

5.4.1 Gen *STAT2*

Gen *STAT2*, kódující protein sloužící v signalizační dráze interferonů jako transduktor signálu a aktivátor transkripce, je dobrým kandidátem na gen, jehož alely mohli anatomicky moderní lidé získat mísením s jinými homininy (Mendez et al., 2012 a). Jeho haplotyp N plně odpovídá dostupné neandertálské sekvenci, je v nízkých procentech (přibližně 5 %) zastoupený v celé euroasijské populaci a chybí v subsaharské Africe. Doba oddělení neandertálské sekvence a haplotypu N je asi 78 000 let před současností a to, společně s jeho geografickým rozšířením a sekvenční podobností, poskytuje pádný důkaz pro přenos tohoto haplotypu mezi neandertálci a moderními lidmi. Další zajímavostí na tomto haplotypu je, že u Melanésanů se vyskytuje s neobvykle vysokou frekvencí (54 %). Mendez se spolupracovníky vylučují vliv pouze genetického driftu a nabízí se možnost, že to je způsobeno pozitivní selekcí. Není ale jasné, zda byl selektován přímo tento gen či nějaký jiný v jeho blízkosti (Mendez et al., 2012 a).

U tohoto genu *STAT2* se též vyskytuje jiný, velice vzácný haplotyp D, který je naopak shodný s denisovanskou sekvencí. Nachází se pouze na Papui-Nové Guineji s frekvencí 9 % a je možné, že byl získán mísením s nedávno objevenými denisovany (Mendez et al., 2012 a).

5.4.2 Skupina genů *OAS*

Skupina genů *OAS* je další z oblastí genomu moderních lidí, jejíž variabilita pravděpodobně vzrostla díky jejich mísení s dalšími homininy. Zdá se, že do této oblasti přispěli jak neandertálci, tak i denisované a to na sobě nezávislými hybridizačními událostmi (Mendez et al., 2013).

Jeden z haplotypů, označovaný R a dlouhý asi 185 kb, je shodných s neandertálskou sekvencí a obsahuje šest polymorfismů. Ty zasahují do genů *OAS1* a *OAS2*, kódujících 2'-5'oligoadenylát syntetázy 1 a 2, mající důležitou funkci v protivirové obraně. Stanovená doba rozdělení haplotypu R od neandertálců je pouze 124 tisíc let před dneškem, mnohem později než odhadovaná doba rozdělení neandertálců od předků anatomicky moderních lidí. Tento haplotyp se nachází převážně v Eurasii, v menší míře i v severovýchodní Africe, ale chybí v Africe subsaharské, což může dokazovat získání tohoto haplotypu od neandertálců (Mendez et al., 2013). Tato oblast genomu byla ovlivněna mísením ještě jednou. U Papuánců je přítomna další odlišná verze tohoto genu, vykazující mnohem větší diversitu v porovnání s jinými oblastmi genomu. Nachází se v ní pět ancestrálních alel, které najdeme pouze u této populace moderních lidí. Tato sekvence je téměř shodná s denisovanskou – liší se pouze na jedné pozici. Společně s faktem, že podle výpočtů provedených Mendezem et al., by tato forma vymizela během 50 tisíc let, je nasnadě, že dnešní Melanéšané získali tuto verzi genu od denisovanů. Avšak oproti všem předpokladům, tato oblast se od stejné oblasti u denisovanů oddělila před 700 000 lety a od oblasti v referenčním lidském genomu dokonce před 3,7 miliony let. Proto se nabízí možnost, že tato sekvence byla přenesena jak do předků dnešních Melanéšanů, tak do denisovanů mísením s další, neznámou skupinou homininů (Mendez et al., 2012 b).

5.4.3 Katabolismus lipidů

Je dost dobře možné, že dnešní Evropané získali od neandertálců geny, které jim mohly poskytnout určitou, i když není jasné jakou, adaptivní výhodu při obývání Evropy (Khamreeva et al., 2014). S využitím dat získaných z genomu neandertálce nalezeného v Altajských horách v jeskyni Denisova, a sekvence složené z DNA Vindijských jedinců, hledali autoři studie funkční skupiny genů, které v populacích moderních lidí vykazují větší míru neandertálských sekvencí. U Evropanů našli poměrně vysoký podíl ($20,8 \pm 2,6$ %) neandertálských sekvencí v genech asociovaných s katabolismem lipidů. Tato hodnota je

překvapivá, protože u obyvatel Východní Asie obsahuje jen $6,7 \pm 0,7$ %. Tyto geny podle získaných dat dosáhly takto vysokých hodnot vlivem pozitivní selekce (Khrameeva et al., 2014). K zjištění fyziologických důsledků prozkoumali koncentrace metabolitů lipidů v prefrontálním kortexu 14 recentních lidí různého původu a 14 šimpanzů. Sedm skupin těchto metabolitů bylo přímo spojeno se zkoumanými geny a koncentrace metabolitů těchto skupin u Evropanů vykazovaly větší odlišnost od šimpanzích, než skupiny se zkoumanými geny nespojené. U jiných recentních populací takový rozdíl mezi metabolickými skupinami nebyl. Vyšší koncentraci metabolitů odpovídala i větší míra exprese šesti genů kódujících enzymy s funkcemi spojitelnými s těmito metabolickými kategoriemi. Těchto šest genů mělo dokonce sekvence shodné s neandertálskými hlavně v blízkosti promotorů a ve větším poměru ($31,6 \pm 4,1$ %) než ostatní geny pro katabolismus lipidů. Je pozoruhodné, že je tento jev pozorovatelný jen v Evropě a ne u Asiatů, což by lépe odpovídalo zastoupení neandertálské DNA ve světě (Green et al., 2010), i když pro lepší stanovení rozsahu výskytu těchto sekvencí by bylo potřeba prozkoumat širší spektrum moderních lidí. Přesné funkce genů katabolismu lipidů s vysokým zastoupením neandertálských sekvencí známy zatím nejsou, ale Khrameeva et al. ve své studii naznačují, že by mohly mít, kromě jiného, i určitou spojitost se zdravotními problémy jako je obezita a hypertriglyceridémie a ovlivňovat hladiny triglyceridů a cholesterolu (Khrameeva et al., 2014).

5.4.4 Komplex *HLA*

Laurent Abi-Rached se svými kolegy provedl studii alel genů pro *HLA* (lidských leukocytárních antigenů) první třídy, které mají významnou roli ve funkci lidského imunitního systému a vysoký polymorfismus. Tento výzkum měl za cíl odhalit, zda jsou nějaké alely v genomu moderních lidí denisovanského původu (Abi-Rached et al., 2011). V genetické sekvenci denisovanské dívky (Reich et al., 2010) objevili po dvou alelách v genech *HLA-A* a *HLA-B*, které byly totožné s alelami moderních lidí a mající vysoký výskyt v Asii a Oceánii. Obzvláště *HLA-A*11:01*, *HLA-C*12:2* a *HLA-C*15* jsou svým zastoupením v populacích moderních lidí zajímavé – první má velmi vysokou frekvence výskytu u Papuánců a Číňanů, dá se nalézt u Evropanů a chybí v Africe a druhé dvě jsou též typické pro Asii a v Africe se téměř nevyskytují (Abi-Rached et al., 2011). Abi-Rached et al. usuzují, že haplotypy *HLA-A*11:01-C*12:2* a *HLA-A*11:01-C*15* byly získány mísením s denisovany. Moderní lidé mohli od této skupiny získat též alelu *HLA-B*73*, která představuje jediného zástupce staré linie *HLA-BII*, vzniklé před 16 milióny let a je ve vazbě

s *C*15* (hlavně subtypy *C*15:05*) i *C*12* (včetně subtypu *C*12:2*). Přenos od denisovanů se tedy přímo nabízí. Avšak v genomu denisovanů tato alela nebyla nalezena (Abi-Rached et al., 2011).

Je možné, že původ těchto alel bude ještě složitější, než se zdá. Variabilita denisovanského *HLA* komplexu byla totiž ovlivněna mísením s neandertálci, jak ukázalo porovnání genomů neandertálce z jeskyně Denisova a denisovanského jedince. *HLA* komplex je jedna z oblastí genomu denisovanů, která vykazuje přítomností haplotypů s krátkou dobou divergence od neandertálských silnější signál o genovém toku mezi těmito skupinami (Prüfer et al., 2014).

Alely *HLA* genů nebyly získány jen genovým tokem od denisovanů. *B*07*, *B*51*, *C*07:02* a *C*16:02* byly pravděpodobně přeneseny do genetické výbavy moderních lidí mísením s neandertálci. Autoři toto tvrzení podporují výskytem těchto alel po celé Eurasii a absencí či nízkou frekvencí v subsaharské Africe a též faktem, že byly identické sekvence nalezeny jak u moderních lidí, tak v genomu neandertálců z jeskyně Vindija (Abi-Rached et al., 2011).

5.4.5 Gen *DMD*

V exonu 44 genu pro dystrofin na chromozómu X se pravděpodobně také nachází haplotyp získaný mísením s jinými homininy. Haplotyp B006 se naprosto shoduje s neandertálskou sekvencí (Green et al., 2010) ve 20 alelách dostupných v této sekvenci (Yotova et al., 2011). B006 je haplotypem nejvíce podobným ancestrálnímu s pouhými 4 odvozenými alelami, z nichž jedna se vyskytuje pouze u tohoto haplotypu a neandertálců. Výskyt haplotypu u všech mimoafrických populací též odpovídá výskytu archaické DNA. V subsaharské Africe se B006 nevyskytuje, s výjimkou nejsevernějších a severovýchodních oblastí. To je ale vysvětlitelné genovým tokem mezi jednotlivými populacemi moderních lidí (Yotova et al., 2011).

5.4.6 Gen *MCPHI*

Gen *MCPHI* kóduje protein mikrocefalin, vyskytující se ve fetálních tkáních a spojovaný s primární mikrocefalií. Bylo naznačeno, že může být odpovědný za velikost mozku (Jackson et al., 2002), což by podporovala i pozorovaná rychlejší evoluce ve fylogenetické linii primátů vedoucí k moderním lidem (Evans et al., 2004 a). K tomu se však vynořily jisté výhrady (Woods et al., 2006) a zdá se, že regulace velikosti mozku nebude primární funkcí tohoto genu. Ve světové populaci se nachází 86 haplotypů, dělicích se do dvou hlavních haploskupin D a non-D, vykazujících značné rozdíly. Haploskupina D je tvořena haplotypem 49, v recentních populacích zdaleka nejpočetnějším (33%), a jeho 42 odvozenými variantami, které dohromady vedou k 70% zastoupení ve světových populacích člověka. K rozvětvení haplotypů v rámci této skupiny došlo před asi 37 000 lety (990 000 let pro non-D haploskupinu). To společně s vysokou frekvencí výskytu haploskupiny D a pozorovanou téměř kompletní vazebnou nerovnováhou kolem alely, odlišující ji od ostatních haploskupin (existují pouze 3 rekombinantní verze), naznačuje, že by tato skupina mohla být pozitivně selektována (Evans et al., 2005). Možnost pozitivní selekce této haploskupiny rozpoutala debatu o správnosti těchto závěrů (Currat et al., 2006; Mekel-Bobrov et al., 2006) a je tedy otázkou, zda je či není selektována. V otázce mísení je však podstatnější, že podle Evanse et al. haploskupina D nevznikla v nedávné době, ale oddělila se od původní společné skupiny s non-D před 1,7 miliony let a dále existovala izolovaně po dobu 530 – 1 100 tisíc let (Evans et al., 2006) Autoři navrhují dva modely následné historie těchto haploskupin. Po oddělení od ancestrální skupiny prodělala populace D výrazný úbytek své efektivní velikosti a následně se kompletně smísila s non-D populací, nebo došlo k ojedinělému mísení s následným vyhynutím původní populace (Evans et al., 2006). Evans et al. z tohoto usuzují, že haploskupina D byla získána mísením s jiným homininem. Nicméně v genomu neandertálců nebyl haplotyp D odhalen (Green et al., 2010), takže se u nich buď vyskytoval polymorfismus v této oblasti nezjištěný z dosud získaných dat, což není příliš v souladu s pozorovanou nízkou heterogenitou neandertálců, anebo zdrojovým homininem byl někdo jiný.

5.4.7 H2 haplotyp

Poněkud sporným kandidátem na oblast genomu získanou mísením s homininy je haplotyp H2. Tento haplotyp, nacházející se na chromozómu 17q21.31, mající délku přibližně 2 Mb a obsahující poměrně značné množství genů (*MAPT*, *CRHR1*, *PLCD3* a další), vykazuje kompletní vazebnou nerovnováhu, tedy v této oblasti neprobíhá rekombinace (Pittman et al., 2004). To společně s faktem, že se haplotyp H2 shoduje se šimpanzí sekvencí v jiných polymorfismech než haplotyp H1, i když jsou H1 a H2 vzájemně příbuznější, naznačuje, že vznikly nezávisle na sobě (Hardy et al., 2005). Haplotyp H2 se vyskytuje převážně v Evropě a na Středním východě a to s frekvencí přibližně 25 % (Evans et al., 2004 b). Tyto jevy by mohlo vysvětlit právě mísení s neandertálcí (Hardy et al., 2005). Naneštěstí, v první kompletní jaderné sekvenci neandertálců tento haplotyp nalezen nebyl (Green et al., 2010) a ani velice nízké zastoupení H2 v Asii (5% ve Střední Asii a prakticky nulové v jihovýchodní Asii a Melanésii) (Evans et al., 2004 b) tuto možnost příliš nepodporuje. Zůstává tedy otázkou, zda haplotyp H2 byl získán genovým tokem od neandertálců kdesi v Evropě, mísením s jinou neznámou skupinou homininů či jeho původ s homininy vůbec nesouvisí.

8. Diskuse

Je mísení jediným možným vysvětlením pozorovaných jevů? Vyšší příbuznost mimoafrických populací s neandertálci by mohla vysvětlit též pravěká substruktura ancestrálních afrických populací. Pokud by v Africe existovaly určité subpopulace homininů s omezeným genovým tokem a jedna z těchto subpopulací by dala vzniknout jak neandertálcům, tak předkům dnešních obyvatel Eurasie, vysvětlila by tato teorie větší příbuznost neandertálců s těmito skupinami než s Afričany (Green et al., 2010; Durand et al., 2011). Existují však poměrně solidní důkazy, které podporují mísení. V první řadě k rozdělení neandertálských sekvencí přítomných v moderních lidech a jedince z Altaje došlo před 77 až 114 tisíci lety (Prüfer et al., 2014), mnohem později než k rozdělení populací neandertálců a předků anatomicky moderních lidí (270 000 – 440 000 let) (Green et al., 2010). Dále, stanovení míry vazebné nerovnováhy mezi jednonukleotidovými polymorfismy neandertálského původu u recentních Evropanů podpořilo možnost genového toku a stanovilo dobu, kdy proběhla poslední výměna genetického materiálu, na období 47 000 – 65 000 let před současností (přesněji před 37 000 - 86 000) (Sankararaman et al., 2012). Mísení též podporují simulace, které provedl Yang et al., 2012, a přítomnost haplotypů některých genů u moderních lidí, shodných s archaickými sekvencemi a dobou divergence odpovídající pravděpodobné době mísení (Mendez et al., 2012 a, 2013). Z těchto důkazů lze usoudit, že ke genovému toku od archaických homininů k moderním lidem došlo, i když africká populační struktura určitý vliv mít mohla.

Ze studia genetického materiálu též vyvstala otázka životaschopnosti hybridů mezi neandertálci a anatomicky moderními lidmi. Neandertálská mtDNA se u dnešních Evropanů nevyskytuje (Richards et al., 1996; Serre et al., 2004) a to podle statistického modelu odpovídá maximálně 120 případům mísení během celé koexistence těchto dvou skupin (Currat a Excoffier, 2004). Další statistický model, který vzal v úvahu informace z jaderné DNA, naznačil, že míra mísení musela být nízká (<2%), jinak by v recentních populacích byla archaická DNA zastoupena ve větším množství. To naznačuje přítomnost reprodukčních bariér, ať už pre- či postzygotických (Currat a Excoffier, 2011). Tato možnost je podpořena identifikací rozsáhlých oblastí v genomu moderních lidí, bohatých na geny, které mají téměř nulový podíl neandertálských sekvencí. To svědčí o negativní selekci proti této archaické DNA a rozmístění těchto oblastí naznačuje, že mužští hybridi mohli být sterilní (Sankararaman et al., 2014). Jelikož ale byly v genomu nalezeny též oblasti neandertálského

původu, pravděpodobně ovlivněné pozitivní selekcí (Khrameeva et al., 2014), zdá se, že otázka hybridů bude ještě složitější.

Získané poznatky o vztazích mezi homininy také poskytují informace o vzniku samotného našeho druhu *Homo sapiens*. Skutečnost, že nacházíme archaickou DNA prakticky ve všech populacích moderních lidí mimo Afriku (Green et al., 2010; Reich et al., 2010; Prüfer et al., 2014) nahrává teorii o africkém původu moderních lidí (též nazývané "Out of Africa"). Ta tvrdí, že anatomicky moderní lidé vznikli na africkém kontinentu a postupně se rozšířili po světě a nahradili původní archaické homininí formy. V upravené podobě, připouštějící určitou míru hybridizace, tato hypotéza nejlépe popisuje vznik moderních lidí v souladu se známými fakty (Stringer, 2014).

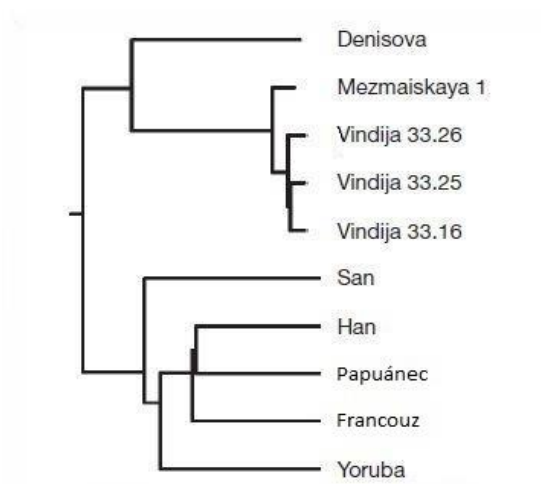
7. Závěr

Studium archaické DNA odhalilo velice složité vztahy mezi populacemi homininů. Tyto skupiny se společně mísily a existují důkazy o genovém toku mezi neandertálci a jejich nově objevenou sesterskou skupinou, nazvanou denisované. Do genetické výbavy denisovanů též přispěla další neidentifikovaná skupina, snad *Homo erectus*, která se mohla mísit i s jedinci nalezenými v Sima de los Huesos. Ani anatomicky moderní lidé se během své expanze z Afriky nevyhnuli tomuto intimnímu kontaktu a nesou ve své genetické výbavě archaickou DNA neandertálského a denisovanského původu. Přes prvotní skepsi vůči možnosti mísení s těmito populacemi, založené na informacích z mtDNA, nalezení dobře zachovalých kostí a úspěšná izolace jejich jaderné DNA ukázaly, že téměř jistě k tomuto blízkému kontaktu došlo a to nejméně dvakrát. V genofondu recentních populací mimoafrického původu nacházíme 1,5 - 2,1 % neandertálské DNA a denisované se podílí $4,8 \pm 0,5$ % na genetické výbavě obyvatel Melanésie a domorodých Australanů. V některých případech si tato archaická DNA stále zachovala svou funkci a ovlivňuje tak variabilitu širokého spektra genů, zahrnujícího geny spojené s imunitními mechanismy, metabolickými procesy a dalšími funkcemi.

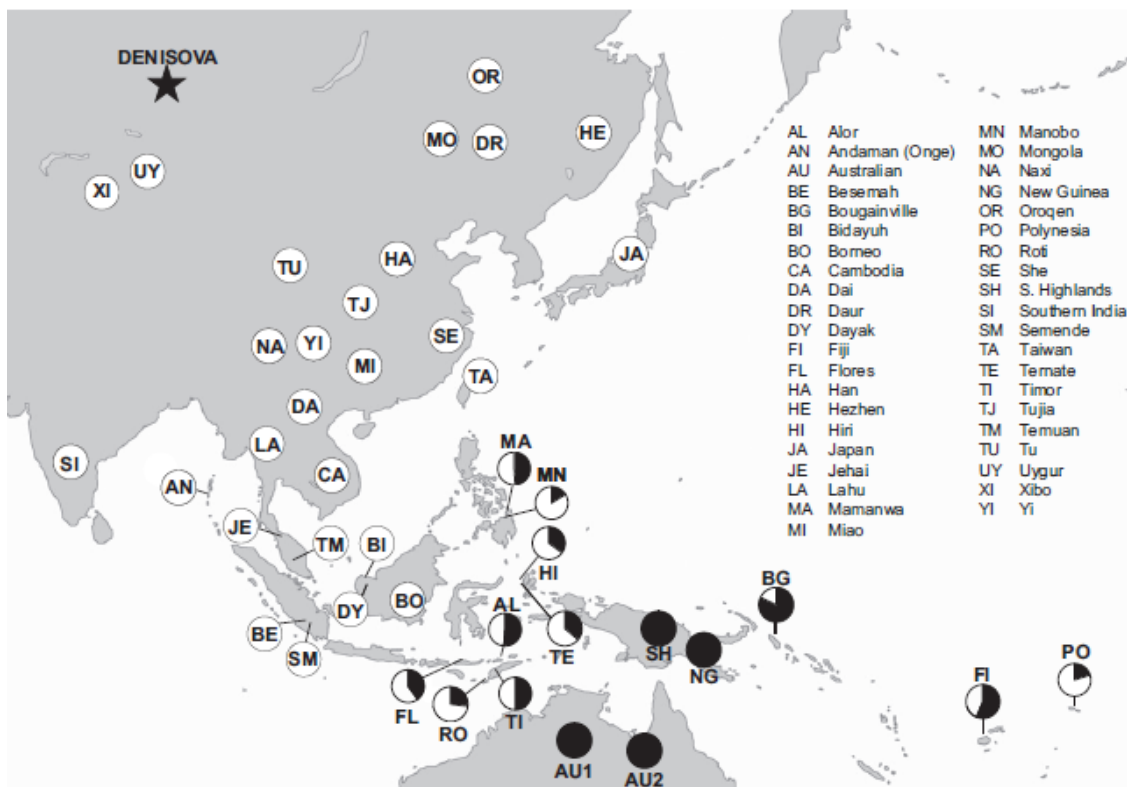
Paleogenetika umožňuje též identifikaci ostatků, u kterých to není standardními morfometrickými metodami možné, a odhaluje skryté vlastnosti dávno vymřelých homininů. Nemalým příspěvkem se podílí i na pochopení historie moderních lidí, ať už při mapování směrů jejich migrací, evolučního původu či identifikaci genů pro nás jedinečných.

Tento obor právě zažívá rozmach a v budoucích letech lze očekávat publikování dalších genetických sekvencí získaných z ostatků pravěkých lidí, pokusy identifikovat nové geny ovlivněné mísením a geny jedinečné pro moderního člověka, které ho činí tím, čím je. S trochou štěstí se snad dočkáme i identifikace neznámého hominina, figurujícího v datech o mísení.

8. Přílohy

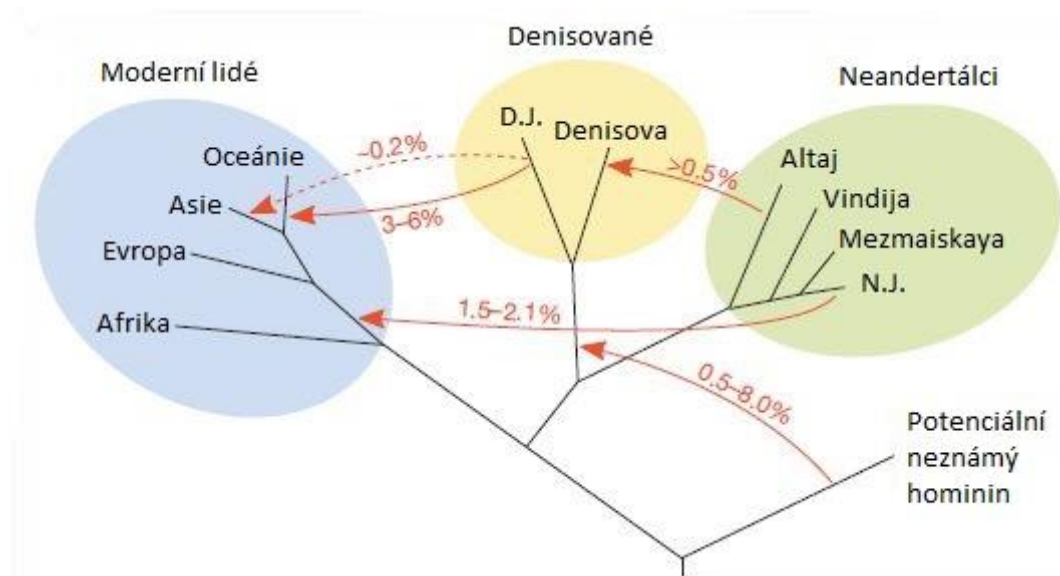


Obr. 1. Fylogenetický strom vypracovaný pomocí divergence párovaných autozomálních DNA sekvencí pěti pravěkých a pěti současných homininů. Převzato z (Reich et al., 2010) a upraveno.



Obr. 2. Denisovanský genetický materiál v Jihovýchodní Asii označený jako zlomek téhož v obyvatelích Nové Guineje

Populace je označena jako mající denisovanský materiál pouze pokud je odhad této hodnoty více než 2 směrodatné odchylky od nuly. Není známo místo sběru vzorků pro AU2 a tudíž je umístění této populace nepřesné. Převzato z (Green et al., 2011).



Obr. 3. Možný model genového toku v Pozdním Pleistocénu

Tento model ukazuje směr a velikost genového toku. Délka větví a doba mísení nejsou v měřítku. Přerušovaná čára označuje nejistotu, zda denisovanský genový tok k moderním lidem byl přímý nebo vedl přes Oceánské populace. D.J. označuje míscího se denisovanského jedince, N.J. míscího se neandertálce. Stáří archaické DNA vylučuje genový tok z moderních lidí do archaických homininů. Převzato z (Prüfer et al., 2014) a upraveno.

9. Použitá literatura

- Abi-Rached L, Jobin MJ, Kulkarni S, McWhinnie A, Dalva K, Gragert L, Babrzadeh F, Gharizadeh B, Luo M, Plummer FA, Kimani J, Carrington M, Middleton D, Rajalingam R, Beksac M, Marsh SGE, Maiers M, Guethlein LA, Tavoularis S, Little A-M, Green RE, Norman PJ, Parham P. 2011. The Shaping of Modern Human Immune Systems by Multiregional Admixture with Archaic Humans. *Science* 334:89–94.
- Beauval C, Maureille B, Lacrampe-Cuyaubère F, Serre D, Peressinotto D, Bordes J-G, Cochard D, Couchoud I, Dubrasquet D, Laroulandie V, Lenoble A, Mallye J-B, Pasty S, Primault J, Rohland N, Pääbo S, Trinkaus E. 2005. A late Neandertal femur from Les Rochers-de-Villeneuve, France. *Proc Natl Acad Sci* 102:7085–7090.
- Bischoff JL, Shamp DD, Aramburu A, Arsuaga JL, Carbonell E, Bermudez de Castro JM. 2003. The Sima de los Huesos Hominids Date to Beyond U/Th Equilibrium (>350 kyr) and Perhaps to 400–500 kyr: New Radiometric Dates. *J Archaeol Sci* 30:275–280.
- Bischoff JL, Williams RW, Rosenbauer RJ, Aramburu A, Arsuaga JL, García N, Cuenca-Bescós G. 2007. High-resolution U-series dates from the Sima de los Huesos hominids yields : implications for the evolution of the early Neanderthal lineage. *J Archaeol Sci* 34:763–770.
- Briggs AW, Good JM, Green RE, Krause J, Maricic T, Stenzel U, Lalueza-Fox C, Rudan P, Brajković D, Kučan Ž, Gušić I, Schmitz R, Doronichev VB, Golovanova LV, Rasilla M de la, Fortea J, Rosas A, Pääbo S. 2009. Targeted Retrieval and Analysis of Five Neandertal mtDNA Genomes. *Science* 325:318–321.
- Caramelli D, Lalueza-Fox C, Condemi S, Longo L, Milani L, Manfredini A, de Saint Pierre M, Adoni F, Lari M, Giunti P, Ricci S, Casoli A, Calafell F, Mallegni F, Bertranpetit J, Stanyon R, Bertorelle G, Barbujani G. 2006. A highly divergent mtDNA sequence in a Neandertal individual from Italy. *Curr Biol CB* 16:R630–632.
- Caramelli D, Lalueza-Fox C, Vernesi C, Lari M, Casoli A, Mallegni F, Chiarelli B, Dupanloup I, Bertranpetit J, Barbujani G, Bertorelle G. 2003. Evidence for a genetic discontinuity between Neandertals and 24,000-year-old anatomically modern Europeans. *Proc Natl Acad Sci* 100:6593–6597.
- Churchill SE, Franciscus RG, McKean-Peraza HA, Daniel JA, Warren BR. 2009. Shanidar 3 Neandertal rib puncture wound and paleolithic weaponry. *J Hum Evol* 57:163–178.
- Cooper A, Stringer CB. 2013. Did the Denisovans Cross Wallace’s Line? *Science* 342:321–323.
- Currat M, Excoffier L, Maddison W, Otto SP, Ray N, Whitlock MC, Yeaman S. 2006. Comment on “Ongoing Adaptive Evolution of ASPM, a Brain Size Determinant in *Homo sapiens*” and “Microcephalin, a Gene Regulating Brain Size, Continues to Evolve Adaptively in Humans.” *Science* 313:172a–172a.

- Currat M, Excoffier L. 2004. Modern Humans Did Not Admix with Neanderthals during Their Range Expansion into Europe. *PLoS Biol* 2:e421.
- Currat M, Excoffier L. 2011. Strong reproductive isolation between humans and Neanderthals inferred from observed patterns of introgression. *Proc Natl Acad Sci* 108:15129–15134.
- Derevianko AP, Shunkov MV, Volkov PV. 2008. A PALEOLITHIC BRACELET FROM DENISOVA CAVE*. *Archaeol Ethnol Anthropol Eurasia* 34:13–25.
- Duarte C, Maurício J, Pettitt PB, Souto P, Trinkaus E, Plicht H van der, Zilhão J. 1999. The early Upper Paleolithic human skeleton from the Abrigo do Lagar Velho (Portugal) and modern human emergence in Iberia. *Proc Natl Acad Sci* 96:7604–7609.
- Durand EY, Patterson N, Reich D, Slatkin M. 2011. Testing for Ancient Admixture between Closely Related Populations. *Mol Biol Evol* 28:2239–2252.
- Evans PD, Anderson JR, Vallender EJ, Choi SS, Lahn BT. 2004a. Reconstructing the evolutionary history of microcephalin, a gene controlling human brain size. *Hum Mol Genet* 13:1139–1145.
- Evans PD, Gilbert SL, Mekel-Bobrov N, Vallender EJ, Anderson JR, Vaez-Azizi LM, Tishkoff SA, Hudson RR, Lahn BT. 2005. Microcephalin, a Gene Regulating Brain Size, Continues to Evolve Adaptively in Humans. *Science* 309:1717–1720.
- Evans PD, Mekel-Bobrov N, Vallender EJ, Hudson RR, Lahn BT. 2006. Evidence that the adaptive allele of the brain size gene microcephalin introgressed into *Homo sapiens* from an archaic *Homo* lineage. *Proc Natl Acad Sci* 103:18178–18183.
- Evans W, Fung HC, Steele J, Eerola J, Tienari P, Pittman A, Silva R de, Myers A, Vrieze FW-D, Singleton A, Hardy J. 2004b. The tau H2 haplotype is almost exclusively Caucasian in origin. *Neurosci Lett* 369:183–185.
- Finlayson C, Giles Pacheco F, Rodríguez-Vidal J, Fa DA, María Gutierrez López J, Santiago Pérez A, Finlayson G, Allue E, Baena Preysler J, Cáceres I, Carrión JS, Fernández Jalvo Y, Gled-Owen CP, Jimenez Espejo FJ, López P, Antonio López Sáez J, Antonio Riquelme Cantal J, Sánchez Marco A, Giles Guzman F, Brown K, Fuentes N, Valarino CA, Villalpando A, Stringer CB, Martinez Ruiz F, Sakamoto T. 2006. Late survival of Neanderthals at the southernmost extreme of Europe. *Nature* 443:850–853.
- Flanagan N, Healy E, Ray A, Philips S, Todd C, Jackson IJ, Birch-Machin MA, Rees JL. 2000. Pleiotropic effects of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene on human pigmentation. *Hum Mol Genet* 9:2531–2537.
- Fuhlrott, JK. 1859. Menschliche Ueberreste aus einer Felsengrotte des Düsselthals: ein Beitrag zur Frage über die Existenz fossiler Menschen. *Verh. naturhist. Ver. preuss. Rheinl.* 16:131–153. (citováno podle Schmitz et al., 2002)
- Gibbons A. 2011. Who Were the Denisovans? *Science* 333:1084–1087.
- Green RE, Briggs AW, Krause J, Prüfer K, Burbano HA, Siebauer M, Lachmann M, Pääbo S. 2009. The Neandertal genome and ancient DNA authenticity. *EMBO J* 28:2494–2502.

- Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, Patterson N, Li H, Zhai W, Fritz MH-Y, Hansen NF, Durand EY, Malaspinas A-S, Jensen JD, Marques-Bonet T, Alkan C, Prüfer K, Meyer M, Burbano HA, Good JM, Schultz R, Aximu-Petri A, Butthof A, Höber B, Höffner B, Siegemund M, Weihmann A, Nusbaum C, Lander ES, Russ C, Novod N, Affourtit J, Egholm M, Verna C, Rudan P, Brajkovic D, Kucan Ž, Gušić I, Doronichev VB, Golovanova LV, Lalueza-Fox C, Rasilla M de la, Fortea J, Rosas A, Schmitz RW, Johnson PLF, Eichler EE, Falush D, Birney E, Mullikin JC, Slatkin M, Nielsen R, Kelso J, Lachmann M, Reich D, Pääbo S. 2010. A Draft Sequence of the Neandertal Genome. *Science* 328:710–722.
- Green RE, Krause J, Ptak SE, Briggs AW, Ronan MT, Simons JF, Du L, Egholm M, Rothberg JM, Paunovic M, Pääbo S. 2006. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature* 444:330–336.
- Green RE, Malaspinas A-S, Krause J, Briggs AW, Johnson PLF, Uhler C, Meyer M, Good JM, Maricic T, Stenzel U, Prüfer K, Siebauer M, Burbano HA, Ronan M, Rothberg JM, Egholm M, Rudan P, Brajković D, Kučan Ž, Gušić I, Wikström M, Laakkonen L, Kelso J, Slatkin M, Pääbo S. 2008. A Complete Neandertal Mitochondrial Genome Sequence Determined by High-Throughput Sequencing. *Cell* 134:416–426.
- Handt O, Krings M, Ward RH, Pääbo S. 1996. The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am J Hum Genet* 59:368–376.
- Hardy J, Pittman A, Myers A, Gwinn-Hardy K, Fung HC, de Silva R, Hutton M, Duckworth J. 2005. Evidence suggesting that *Homo neanderthalensis* contributed the H2 MAPT haplotype to *Homo sapiens*. *Biochem Soc Trans* 33:582.
- Hofreiter M, Jaenicke V, Serre D, Haeseler A von, Pääbo S. 2001a. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res* 29:4793–4799.
- Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S. 2001b. Ancient DNA. *Nat Rev Genet* 2:353–359.
- Hrdlička A. 1927. The Neanderthal Phase of Man. *J R Anthropol Inst G B Irel* 57:249–274.
- Hublin JJ. 2009. The origin of Neandertals. *Proc Natl Acad Sci* 106:16022–16027.
- Jackson AP, Eastwood H, Bell SM, Adu J, Toomes C, Carr IM, Roberts E, Hampshire DJ, Crow YJ, Mighell AJ, Karbani G, Jafri H, Rashid Y, Mueller RF, Markham AF, Woods CG. 2002. Identification of Microcephalin, a Protein Implicated in Determining the Size of the Human Brain. *Am J Hum Genet* 71:136–142.
- Khrameeva EE, Bozek K, He L, Yan Z, Jiang X, Wei Y, Tang K, Gelfand MS, Prüfer K, Kelso J, Pääbo S, Giavalisco P, Lachmann M, Khaitovich P. 2014. Neanderthal ancestry drives evolution of lipid catabolism in contemporary Europeans. *Nat Commun* [Internet] 5. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4584>
- Krause J, Fu Q, Good JM, Viola B, Shunkov MV, Derevianko AP, Pääbo S. 2010. The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia. *Nature* 464:894–897.

- Krause J, Lalueza-Fox C, Orlando L, Enard W, Green RE, Burbano HA, Hublin J-J, Hänni C, Fortea J, de la Rasilla M, Bertranpetit J, Rosas A, Pääbo S. 2007a. The Derived FOXP2 Variant of Modern Humans Was Shared with Neandertals. *Curr Biol* 17:1908–1912.
- Krause J, Orlando L, Serre D, Viola B, Prüfer K, Richards MP, Hublin J-J, Hänni C, Derevianko AP, Pääbo S. 2007b. Neanderthals in central Asia and Siberia. *Nature* 449:902–904.
- Krings M, Geisert H, Schmitz RW, Krainitzki H, Pääbo S. 1999. DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neandertal type specimen. *Proc Natl Acad Sci* 96:5581–5585.
- Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Pääbo S. 1997. Neandertal DNA Sequences and the Origin of Modern Humans. *Cell* 90:19–30.
- Lalueza-Fox C, Gigli E, Rasilla M de la, Fortea J, Rosas A. 2009. Bitter taste perception in Neanderthals through the analysis of the TAS2R38 gene. *Biol Lett* 5:809–811.
- Lalueza-Fox C, Krause J, Caramelli D, Catalano G, Milani L, Sampietro ML, Calafell F, Martínez-Maza C, Bastir M, García-Taberner A, de la Rasilla M, Fortea J, Pääbo S, Bertranpetit J, Rosas A. 2006. Mitochondrial DNA of an Iberian Neandertal suggests a population affinity with other European Neandertals. *Curr Biol CB* 16:R629–630.
- Lalueza-Fox C, Römpler H, Caramelli D, Stäubert C, Catalano G, Hughes D, Rohland N, Pilli E, Longo L, Condemi S, Rasilla M de la, Fortea J, Rosas A, Stoneking M, Schöneberg T, Bertranpetit J, Hofreiter M. 2007. A Melanocortin 1 Receptor Allele Suggests Varying Pigmentation Among Neanderthals. *Science* 318:1453–1455.
- Lalueza-Fox C, Rosas A, Estalrich A, Gigli E, Campos PF, García-Taberner A, García-Vargas S, Sánchez-Quinto F, Ramírez O, Civit S, Bastir M, Huguet R, Santamaría D, Gilbert MTP, Willerslev E, Rasilla M de la. 2011. Genetic evidence for patrilocal mating behavior among Neandertal groups. *Proc Natl Acad Sci* 108:250–253.
- Lalueza-Fox C, Sampietro ML, Caramelli D, Puder Y, Lari M, Calafell F, Martínez-Maza C, Bastir M, Fortea J, Rasilla M de la, Bertranpetit J, Rosas A. 2005. Neandertal Evolutionary Genetics: Mitochondrial DNA Data from the Iberian Peninsula. *Mol Biol Evol* 22:1077–1081.
- Lindahl T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709–715.
- Martínez I, Arsuaga JL. 1997. The temporal bones from Sima de los Huesos Middle Pleistocene site (Sierra de Atapuerca, Spain). A phylogenetic approach. *J Hum Evol* 33:283–318.
- Martinón-Torres M, Bermúdez de Castro JM, Gómez-Robles A, Prado-Simón L, Arsuaga JL. 2012. Morphological description and comparison of the dental remains from Atapuerca-Sima de los Huesos site (Spain). *J Hum Evol* 62:7–58.
- Mednikova MB. 2011. A proximal pedal phalanx of a Paleolithic hominin from Denisova cave, Altai. *Archaeol Ethnol Anthropol Eurasia* 39:129–138.

- Mekel-Bobrov N, Evans PD, Gilbert SL, Vallender EJ, Hudson RR, Lahn BT. 2006. Response to Comment on “Ongoing Adaptive Evolution of ASPM, a Brain Size Determinant in *Homo sapiens*” and “Microcephalin, a Gene Regulating Brain Size, Continues to Evolve Adaptively in Humans.” *Science* 313:172b–172b.
- Mendez FL, Watkins JC, Hammer MF. 2012a. A Haplotype at STAT2 Introgressed from Neanderthals and Serves as a Candidate of Positive Selection in Papua New Guinea. *Am J Hum Genet* 91:265–274.
- Mendez FL, Watkins JC, Hammer MF. 2012b. Global Genetic Variation at OAS1 Provides Evidence of Archaic Admixture in Melanesian Populations. *Mol Biol Evol* 29:1513–1520.
- Mendez FL, Watkins JC, Hammer MF. 2013. Neandertal Origin of Genetic Variation at the Cluster of OAS Immunity Genes. *Mol Biol Evol* 30:798–801.
- Meyer M, Fu Q, Aximu-Petri A, Glocke I, Nickel B, Arsuaga J-L, Martínez I, Gracia A, de Castro JMB, Carbonell E, Pääbo S. 2014. A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos. *Nature* 505:403–406.
- Meyer M, Kircher M, Gansauge M-T, Li H, Racimo F, Mallick S, Schraiber JG, Jay F, Prüfer K, Filippo C de, Sudmant PH, Alkan C, Fu Q, Do R, Rohland N, Tandon A, Siebauer M, Green RE, Bryc K, Briggs AW, Stenzel U, Dabney J, Shendure J, Kitzman J, Hammer MF, Shunkov MV, Derevianko AP, Patterson N, Andrés AM, Eichler EE, Slatkin M, Reich D, Kelso J, Pääbo S. 2012. A High-Coverage Genome Sequence from an Archaic Denisovan Individual. *Science* 338:222–226.
- Noonan JP, Coop G, Kudaravalli S, Smith D, Krause J, Alessi J, Chen F, Platt D, Pääbo S, Pritchard JK, Rubin EM. 2006. Sequencing and Analysis of Neanderthal Genomic DNA. *Science* 314:1113–1118.
- Orlando L, Darlu P, Toussaint M, Bonjean D, Otte M, Hänni C. 2006. Revisiting Neandertal diversity with a 100,000 year old mtDNA sequence. *Curr Biol* 16:R400–R402.
- Ovchinnikov IV, Götherström A, Romanova GP, Kharitonov VM, Lidén K, Goodwin W. 2000. Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature* 404:490–493.
- Pääbo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Després V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, Hofreiter M. 2004. Genetic Analyses from Ancient Dna. *Annu Rev Genet* 38:645–679.
- Pääbo S. 1989. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci* 86:1939–1943.
- Pittman AM, Myers AJ, Duckworth J, Bryden L, Hanson M, Abou-Sleiman P, Wood NW, Hardy J, Lees A, Silva R de. 2004. The structure of the tau haplotype in controls and in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 13:1267–1274.
- Prüfer K, Racimo F, Patterson N, Jay F, Sankararaman S, Sawyer S, Heinze A, Renaud G, Sudmant PH, de Filippo C, Li H, Mallick S, Dannemann M, Fu Q, Kircher M, Kuhlwilm M, Lachmann M, Meyer M, Ongyerth M, Siebauer M, Theunert C, Tandon

- A, Moorjani P, Pickrell J, Mullikin JC, Vohr SH, Green RE, Hellmann I, Johnson PLF, Blanche H, Cann H, Kitzman JO, Shendure J, Eichler EE, Lein ES, Bakken TE, Golovanova LV, Doronichev VB, Shunkov MV, Derevianko AP, Viola B, Slatkin M, Reich D, Kelso J, Pääbo S. 2014. The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature* 505:43–49.
- Reich D, Green RE, Kircher M, Krause J, Patterson N, Durand EY, Viola B, Briggs AW, Stenzel U, Johnson PLF, Maricic T, Good JM, Marques-Bonet T, Alkan C, Fu Q, Mallick S, Li H, Meyer M, Eichler EE, Stoneking M, Richards M, Talamo S, Shunkov MV, Derevianko AP, Hublin J-J, Kelso J, Slatkin M, Pääbo S. 2010. Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature* 468:1053–1060.
- Reich D, Patterson N, Kircher M, Delfin F, Nandineni MR, Pugach I, Ko AM-S, Ko Y-C, Jinam TA, Phipps ME, Saitou N, Wollstein A, Kayser M, Pääbo S, Stoneking M. 2011. Denisova Admixture and the First Modern Human Dispersals into Southeast Asia and Oceania. *Am J Hum Genet* 89:516–528.
- Richards M, Corte-Real H, Forster P, Macaulay V, Wilkinson-Herbots H, Demaine A, Papiha S, Hedges R, Bandelt HJ, Sykes B. 1996. Paleolithic and neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *Am J Hum Genet* 59:185–203.
- Sankararaman S, Mallick S, Dannemann M, Prüfer K, Kelso J, Pääbo S, Patterson N, Reich D. 2014. The genomic landscape of Neanderthal ancestry in present-day humans. *Nature* 507:354–357.
- Sankararaman S, Patterson N, Li H, Pääbo S, Reich D. 2012. The Date of Interbreeding between Neandertals and Modern Humans. *PLoS Genet* 8:e1002947.
- Schmitz RW, Serre D, Bonani G, Feine S, Hillgruber F, Krainitzki H, Pääbo S, Smith FH. 2002. The Neandertal type site revisited: Interdisciplinary investigations of skeletal remains from the Neander Valley, Germany. *Proc Natl Acad Sci* 99:13342–13347.
- Scholz M, Bachmann L, Nicholson GJ, Bachmann J, Giddings I, Rüschoff-Thale B, Czarnetzki A, Pusch CM. 2000. Genomic Differentiation of Neanderthals and Anatomically Modern Man Allows a Fossil–DNA–Based Classification of Morphologically Indistinguishable Hominid Bones. *Am J Hum Genet* 66:1927–1932.
- Serre D, Langaney A, Chech M, Teschler-Nicola M, Paunovic M, Mennecier P, Hofreiter M, Possnert G, Pääbo S. 2004. No Evidence of Neandertal mtDNA Contribution to Early Modern Humans. *PLoS Biol* 2:e57.
- Stringer C. 2012. The status of *Homo heidelbergensis* (Schoetensack 1908). *Evol Anthropol Issues News Rev* 21:101–107.
- Stringer C. 2014. Why we are not all multiregionalists now. *Trends Ecol Evol* 29:248–251.
- Tattersall I, Schwartz JH. 1999. Hominids and hybrids: The place of Neanderthals in human evolution. *Proc Natl Acad Sci* 96:7117–7119.
- Trinkaus E, Moldovan O, Milota Ş, Bilgăr A, Sarcina L, Athreya S, Bailey SE, Rodrigo R, Mircea G, Higham T, Ramsey CB, Plicht J van der. 2003. An early modern human from the Peştera cu Oase, Romania. *Proc Natl Acad Sci* 100:11231–11236.

- Trinkaus E. 2007. European early modern humans and the fate of the Neandertals. *Proc Natl Acad Sci* 104:7367–7372.
- Wall JD, Kim SK. 2007. Inconsistencies in Neanderthal Genomic DNA Sequences. *PLoS Genet* 3:e175.
- Woods RP, Freimer NB, Young JAD, Fears SC, Sicotte NL, Service SK, Valentino DJ, Toga AW, Mazziotta JC. 2006. Normal variants of Microcephalin and ASPM do not account for brain size variability. *Hum Mol Genet* 15:2025–2029.
- Yang MA, Malaspinas A-S, Durand EY, Slatkin M. 2012. Ancient Structure in Africa Unlikely to Explain Neanderthal and Non-African Genetic Similarity. *Mol Biol Evol* 29:2987–2995.
- Yotova V, Lefebvre J-F, Moreau C, Gbeha E, Hovhannesian K, Bourgeois S, Bédarida S, Azevedo L, Amorim A, Sarkisian T, Avogbe PH, Chabi N, Dicko MH, Amouzou ESKS, Sanni A, Roberts-Thomson J, Boettcher B, Scott RJ, Labuda D. 2011. An X-Linked Haplotype of Neanderthal Origin Is Present Among All Non-African Populations. *Mol Biol Evol* 28:1957–1962.