

Genetická genealogie – sledování rodových linií pomocí analýzy DNA II. Mitochondriální DNA

Genetický materiál se předává z generace na generaci a každá buňka našeho těla nese kódovanou zprávu od našich předků. Nyní je v našich silách dešifrovat toto sdělení z minulosti. Bryan Sykes (britský genetik)

V lednu 1987 otiskl časopis Nature článek Mitochondriální DNA a evoluce člověka (Mitochondrial DNA and Human Evolution, autoři Rebecca Cann, Mark Stoneking a Allan Wilson). Publikovaná data obsahovala výsledky restriktivního mapování (analýza fragmentů vzniklých štěpením DNA restriktivními enzymy) mitochondriálního genomu 147 osob z pěti geografických oblastí. Jasně ukázaly, že nejbližším společným předkem všech těchto osob byla žena, která žila asi před 200 000 lety v Africe. Na základě dalších studií bylo určeno, že tato „genetická pramáti“ Eva žila ve východní Africe pravděpodobně na území dnešní Keni, Tanzanie nebo Etiopie. Doba, před kterou Eva žila, se odhaduje na základě genetických a pravděpodobnostních studií na 70 000–270 000 let (tab. 1). V každém z nás se z této ženy zachovala mitochondriální DNA, kterou matky předávají svým potomkům, dcerám i synům. Pouze dcery však mohou mitochondriální DNA předat dalším generacím. Mitochondriální DNA (mtDNA) se totiž dědí po mateřské linii, přičemž frekvence vzniku jedné změny (nových mutací) mezi mtDNA v linii matky a jejich potomků je přibližně 2 000 let (Santos 2005, Henn 2008). Tento odhad se vztahuje na jeden nukleotid kontrolní oblasti mtDNA a vychází ze studií rodokmenů a forenzních databází. Pokud bychom pro něj použili pouze fylogenetické odhady založené na porovnání mezi druhy, dostaneme číslo, které se může lišit až desetinásobně (Rand 2008).

Zajímavé je srovnání DNA včetně mtDNA neandertálců a moderního člověka. Svante Paabo z Max Planckova institutu pro evoluční antropologii v Lipsku určil na základě DNA analýzy kosterních pozůstatků neandertálců, že *Homo neanderthalensis* a *H. sapiens* mají shodných více než 99,5 % DNA. V r. 2008 publikoval Richard Green v časopise Nature úplnou sekvenci mtDNA neandertálců. Pokud porovnáme jejich mtDNA s cambridgeskou referenční sekvencí mtDNA lidí (viz dále), zjistíme 206 rozdílů (195 tranzicí a 11 transverzí). Tranzicí nazýváme takovou mutaci, při níž dochází v DNA k záměně nukleotidu s purinovou dusíkatou bází za nukleotid s jinou purinovou bází nebo k záměně pyrimidinové báze za jinou pyrimidinovou. Při transverzi se zamění nukleotid s purinovou bází za nukleotid s pyrimidinovou nebo naopak. Na základě těchto výsledků můžeme odvodit, že společný předek neandertálce a člověka žil asi před 660 000 lety. V této souvislosti je nutno poznamenat, že společný předek šimpanze a člověka žil před 4–6 miliony let a tento údaj se také používá pro kalibraci při výpočtech stáří jednotlivých linií mtDNA.

Mitochondriální genom

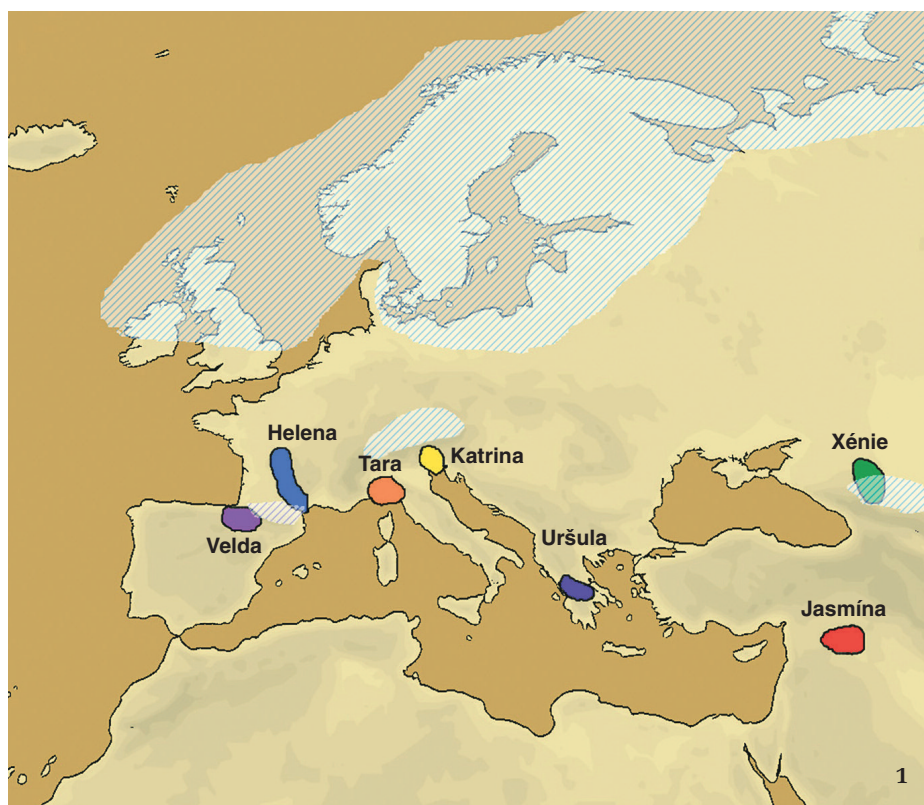
Mitochondrie jsou orgány, jež se nacházejí mimo jádro v cytoplazmě buňky a jejich funkcí je zjednodušeně řečeno výroba energie ve formě ATP. Mitochondrie mají vlastní genom – kruhové molekuly DNA o velikosti 16 569 párů bází, jejichž varianty jsou identifikovány sekvencováním. Mitochondriální genom člověka je velice kompaktní. Obsahuje 37 genů – 2 geny rRNA, 22 genů tRNA a 13 genů kódujících proteiny zapojené do respirace a DNA replikace, transkripce a translace. Pouze malá oblast genomu je nekódující. Restriktivní místo *Mbo I* uvnitř hlavní nekódující oblasti bylo vybráno jako počátek

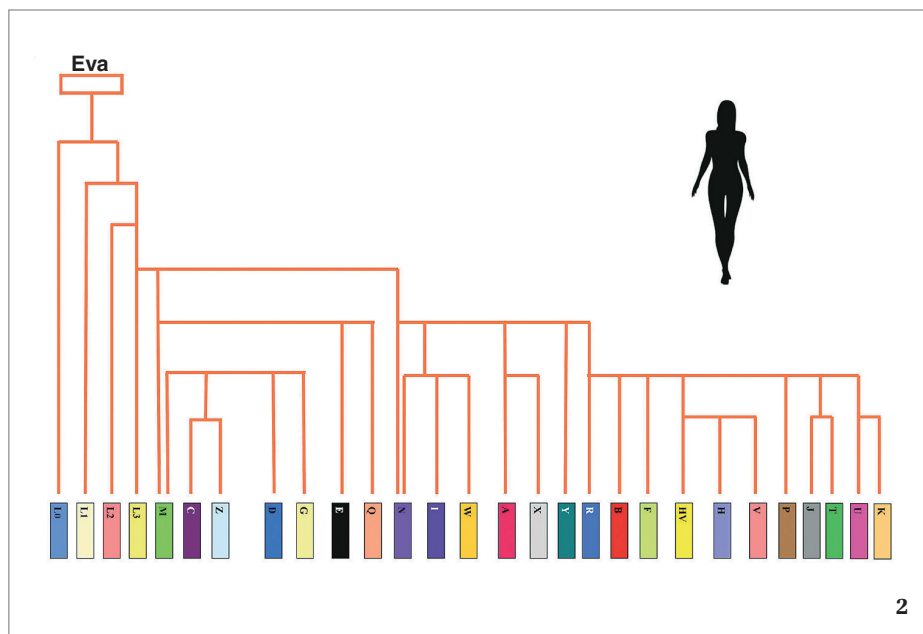
Tab. 1 Odhady stáří genetické pramáti Evy se podle různých autorů pohybují okolo hodnoty 200 000 let.

Autor	Odhadnuté stáří v letech
R. Cann (1987)	42 500 až 285 000
L. Vigilant (1991)	166 000 až 249 000
M. Ingman (2000)	121 000 až 221 000
M. Gonder (2007)	160 000 až 226 000
P. Endicott (2009)	108 000

1 Místa vzniku 7 evropských linií mitochondriální DNA (7 dcer Eviných). Šrafováním je vyznačen maximální rozsah ledovců v poslední době ledové (LGM – Last Glacial Maximum). Podle: B. Sykes (7 Daughters of Eve, 2001), orig. D. Vaněk

2 Zjednodušený strom haploskupin mitochondriální DNA. Na úplném vrcholu stromu si můžeme představit „genetickou“ pramáti Evu, v jejíž mtDNA se v průběhu tisíciletí objevovaly mutace, které dnes slouží k odlišení jednotlivých haploskupin. Délky úseček nejsou proporcionální ke stáří jednotlivých haploskupin. Orig. D. Vaněk





cirkulární DNA. Analýza mtDNA pro identifikační a genealogické účely je zaměřena zejména na první a druhou hypervariabilní oblast (HVR1 a HVR2) kontrolní oblasti mtDNA (neobsahuje kódující sekvence), která se také nazývá D-smyčka. Tato oblast, o kterou se tedy při analýze mtDNA především zajímáme, je velká pouze 1 050 bází (přibližně 7 % genomu mtDNA). Jelikož mutace v této kontrolní oblasti nemají přímý vliv na životaschopnost organismu, je jejich zkoumání pro genealogické a fylogenetické účely vhodnější, a to zejména s ohledem na vyšší mutační rychlost v porovnání s kódujícími oblastmi. Dalším důvodem je existence rozsáhlých DNA databází, kde jsou uloženy sekvence HVR1 a HVR2 statisíců osob.

Kompletní sekvence mtDNA člověka byla publikována v časopise Nature již v r. 1981 (S. Anderson). Tato sekvence, všeobecně známá jako Andersonova, je standardem, se kterým se porovnávají variace v sekvenci mtDNA. V odborné literatuře se často označuje zkratkou CRS (Cambridge Reference Sequence – cambridgeská referenční sekvence). Polymor-

fismy (místa, kde se sekvence u různých jedinců může lišit) jsou obvykle indikovány jako odchylky od této sekvence. Např. záměna (substituce) nukleotidu thyminu (T) za cytozin (C) v pozici nukleotidu 16519 bude vyznačena jako T16519C, vložení (inzerce) jednoho nukleotidu na pozici 315 bude vyznačeno jako 315,1C a ztráta (delece) nukleotidu na pozici 16523 se označí jako 16523-. Porovnáním sekvencí HVR1 a HVR2 u dostatečně velkého počtu nepřibuzných osob zjistíme, že některé jsou zcela shodné, nebo mají alespoň stejnou sekvenci odchylnou od CRS. Tyto skupiny shodných či příbuzných motivů pak zařazujeme do haploskupin mitochondriální DNA (obr. 2).

Bryan Sykes popsal ve své knize 7 dcer Eviných (2001) celou řadu haploskupin mtDNA, zejména se věnoval haploskupinám charakteristickým pro Evropu. Sedm klanů, ve kterých žily zakladatelky určitých linií mtDNA, nazval ženskými jmény Helena, Jasmína, Katrina, Uršula, Tara, Velda a Xénie. Rozmístění těchto klanů mtDNA znázorňuje obr. 1. Tyto haploskupiny mtDNA nacházíme nejčastěji v evrop-



3 Vyobrazení lidí žijících ve svrchním paleolitu, tzv. „lovců mamutů“, od Maxe Švabinského (Pravěk Čech. R. R. Hofmeister, Praha 1925)

ské populaci. Další v Evropě zastoupená haploskupina I (Iris) má původ pravděpodobně na Ukrajině, haploskupina M se stejně jako haploskupina W vyvinula z africké větve L3. Jednotlivé „evropské“ haploskupiny mtDNA však nejsou stejně staré. Doba, před kterou vznikly, je následující: Uršula (U) + Katrina (K) – 50 000 let, Iris (I) + Xénie (X) – 30 000 let, Helena (H) – 20 000 let, Velda (V) – 12 000 let a Jasmína (J) + Tara (T) – 10 000 let (The Genographic Project 2009). Údaje o stáří haploskupin však mohou být zatíženy chybou až +/- 5 000 let, a to zejména z důvodu předpokládaných rozdílů v mutačních rychlostech způsobených limitní velikostí populace (Henn 2008). Pokud je totiž počet jedinců v populaci omezen, poklesne variabilita (počet variant), ale např. s odstupem 50 tisíc let není možné zjistit, jak tato snížená variabilita ovlivnila naše odhady doby vzniku mutací.

Tab. 2 Přibližné procentuální zastoupení jednotlivých haploskupin mtDNA ve vybraných oblastech. Barevně jsou zvýrazněny frekvence výskytu nad 10 % a tučným písmem hodnoty nad 20 %. Frekvence výskytu v intervalu 0,1–0,9 % je označena jako M. U České republiky (použitá data podle: B. A. Maljarčuk 2006) jsou hodnoty zaokrouhleny k nejbližšímu celému číslu. N.D.= neurčeno. Úpraveno podle: E. Ruiz-Pesini (2007)

Hg mtDNA oblast	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	N.D.
Afrika								17	0	5	2	46	3	1	0		4	15	3	0	1			3
Střední východ	1	M	1	1		0	0	22	2	13	5	6	2	4	1	0	9	15	1	2	3	0	0	13
Austrálie a Oceánie		23										1	7	48	7									14
Západní Evropa				1		0		41	2	9	5	1	1	1	0		8	18	7	2	2		0	3
Východní Evropa	1	M	2	2		1	1	35	2	8	4		2	1	1		11	22	3	1	1	0	1	
Kavkaz	1	M	4	4		1		23	2	7	6	0	1	3	3		10	22	1	2	4		0	7
Střední Asie	7	5	12	15		5	5	15	1	3	1	0	6	2	1		6	10	0	2	0	1	2	3
Východní Asie	7	16	5	26	0	11	4	1		1			15	3	2		0	M		0		1	2	7
Sibiř	8	3	30	19	0	4	5	4	0	2	0		3	3	1	1	2	6	0	0	0	4	1	5
Severní Amerika	43	23	18	10	1																	3		2
Jižní a Střední Amerika	28	27	21	19	1							2		2						0				2
Česká republika	M							44	3	12	4		2	2			12	15	M	2				

Další komplikací je poměrně malá velikost mitochondriální DNA, a tudíž omezený prostor pro vznik rozlišujících mutací. Mitochondriální DNA tak neumožňuje ani příliš přesné sledování trasy migrace předků. Všechny evropské haploskupiny mtDNA (H, I, J, K, T, U, V, W a X s výjimkou X2a), nebo přesněji jejich charakteristické mutace, se objevily během poslední doby ledové či těsně před ní, kdy se lidé živilí jako lovci a sběrači (Soares 2009). Tab. 2 uvádí u jednotlivých oblastí přibližné procentuální zastoupení jednotlivých haploskupin mtDNA a pro srovnání také zastoupení v České republice (Maljarčuk 2006). Pokud publikovaná data pro ČR porovnáme se záznamy v internetové české databázi DNA (www.genebase.cz), zjistíme u některých haploskupin poměrně značné rozdíly v procentuálním zastoupení v populaci. Vysvětlením tohoto fenoménu může být rozdílná metoda vzorkování (výběr testovaných osob a jejich počet) a také metoda zjišťování odchylek od Andersonovy referenční sekvence CRS.

Co můžeme zjistit o svém maternálním klanu pomocí analýzy mtDNA?

Pro analýzu vlastní mtDNA můžeme použít jakékoli buňky lidského těla. V současné době je trendem provádět odběr vzorku stěrem ze sliznice dutiny ústní. Průměrně můžeme z jednoho stěru získat až tisícinásobek množství, které je zapotřebí pro úspěšné namnožení cílové hypervariabilní oblasti (HVR1 a HVR2) mitochondriální DNA pomocí PCR (Polymerase Chain Reaction – polymerázová řetězová reakce). Po přečištění produktu PCR reakce ve speciálních kolonkách následuje sekvenční reakce (v termocyklu) a kapilární elektroforéza (v sekvenátoru). Výstupem analýzy je sekvence nukleotidů v namnožené oblasti, v našem případě tedy získáme data pro HVR1 a 2. Ta pak porovnáme s referenční CRS sekvencí a určíme odchylky. Výstupem může být následující záznam:

HVR1 16063C; 16069T; 16126C; 16294T

HVR2 73G; 185A; 263G; 295T; 309,1C; 315,1C

Pokud tyto odchylky od CRS porovnáme s mutacemi charakteristickými pro jednotlivé haploskupiny, zjistíme, že mateřská linie dárce vzorku patří do haploskupiny J. V České republice je nositelem této haploskupiny přibližně 12 % obyvatel a všichni budou mít stejnou nebo velmi podobnou sekvenci HVR1 a HVR2. Kromě zjištění příslušnosti k haploskupině mtDNA můžeme ještě naše výsledky porovnat s dalšími osobami. Pokud zadáme sekvenci hypervariabilní oblasti mtDNA do veřejně dostupných databází (www.mitosearch.org, www.smgf.org), můžeme zjistit poměrně velké množství osob se shodnou či velmi podobnou sekvencí charakteristickou pro tuto evropskou haploskupinu. Ze shody určené pouze na základě analýzy mtDNA nelze vyvozovat žádné závěry ohledně příbuzenského vztahu s osobami nalezenými v databázi. Analýza mtDNA ale může poměrně dobře ukázat na geografickou oblast, kde se v dávných dobách ledových objevila mateřská linie našeho rodu.

Tab. 3 Sekvence hypervariabilní oblasti mtDNA slavných osob

Jméno	Haploskupina	Odchylky od CRS
Dánský král Sweyn II.	H5a	16093C, 16304C
Car Nikolaj II.	T2	16126C, 16169Y*, 16294T, 16296T, 73G, 263G, 315.1C
Jesse James	T2	16126C, 16274A, 16294T, 16296T, 16304C
Carevna Alexandra Fjodorovna	H	263G, 315.1C, 16111T, 16357C
Marie Antoinetta	H	16519C 152C, 194T, 263G, 315.1C
Marie Terezie	H	152C, 194T, 263G, 315.1C, 16519C
Ůtzi (Ice Man)	K	16224C, 16311C
<i>Homo neanderthalensis</i> AF011222 (pouze výsledky HVR1)	–	16037G, 16078G, 16093C, 16107T, 16108T, 16111T 16112T, 16129A, 16139T, 16148T, 16154C, 16169T 16183., 16189C, 16193.C, 16209C, 16223T, 16230G 16234T, 16244A, 16256A, 16258G, 16262T, 16263.A 16278T, 16299G, 16311C, 16320T, 16362C, 16400T

*heteroplazmie (heterogenní mtDNA, některé molekuly jsou mutovány – pokud vznikne mutace v molekule mtDNA, tak můžeme v průběhu generací detekovat vzrůstající množství nové varianty mtDNA při současné detekci sekvence původní, mitochondriální DNA je v takovýchto případech heterogenní)

Identifikační schopnost hypervariabilních oblastí mtDNA bohužel není taková, aby bylo možné pomocí analýzy mitochondriální DNA sledovat ženské linie s takovou přesností jako mužské linie podle chromozomu Y. Důvodem je nepoměrně menší velikost mtDNA ve srovnání s chromozomem Y (cca 16 569 párů bází mtDNA proti celému chromozomu o velikosti 58 milionů párů bází), a tím nepoměrně menší možnosti vzniku detekovatelných mutací. V každém případě je ale výhodou, že každá lidská buňka obsahuje stovky až tisíce mitochondrií. Z tohoto důvodu jsou úlomky vlasů, staré kosti nebo zuhelnatělé pozůstatky dostatečným zdrojem materiálu pro analýzu mtDNA, a to i když techniky zaměřené na analýzu chromozomové DNA selhávají. Tohoto fenoménu bylo s úspěchem využito např. při identifikaci pozůstatků ruské carské rodiny Romanovců (Gill 1994).

Mitochondriální DNA slavných osob

Díky tomu, že mtDNA je nepoměrně stabilnější než jaderná DNA, můžeme získat přepis sekvence hypervariabilních oblastí mtDNA i z artefaktů pocházejících ze slavných osob (ISOGG 2009). V tab. 3 jsou kromě výsledků již zmíněné carské rodiny uvedeny i sekvence mtDNA neandertálců (Ovchinnikov 2001).

Výsledky analýzy mitochondriální DNA nám mohou přinést mnoho zajímavých



4 *Homo neanderthalensis*. Rekonstrukce podle nalezu Shanidar I. Olej na plátně (40x30 cm). Orig. P. Modlitba

informací o kořenech našeho mateřského rodinného klanu, ale při zpracování tisíců záznamů můžeme také zjistit nová fakta o osidlování kontinentů po poslední době ledové nebo určit dobu a místo vzniku specifické mutace na mtDNA.

Zajímavé odkazy na internetové stránky zabývající se genetickou genealogií (viz také první díl článku v Živě 2009, 6: 247–249)

Popis	Internetová adresa
Veřejně dostupné databáze haplotypů chromozomu Y	www.yhrd.org www.ysearch.org www.smgf.org
Veřejně dostupné databáze sekvencí hypervariabilní oblasti mtDNA	www.mitosearch.org www.smgf.org
Genografický projekt National Geographic	genographic.nationalgeographic.com
Databáze české DNA (chromozom Y + mtDNA)	genebase.cz/cgi-bin/czdna.cgi
Journal of Genetic Genealogy (ISSN: 1557-3796)	www.jogg.info
International Society of Genetic Genealogy	www.isogg.org
Internetová STRbáze amerického NIST	http://www.cstl.nist.gov/strbase/