

PŮVODNÍ PRÁCE

GENETICKÉ URČENÍ BARVY
OČÍ U JEDINCŮ Z POHŘEBIŠTĚ
ZNOJMO-HRADIŠTĚGenetic Determination of Iris Color
of individuals from Znojmo-Hradiště
Burial SitePetra Lysáková¹, Kristýna Brzobohatá¹,
Eva Drozdová¹, Bohuslav Klíma²¹Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta,
Masarykova univerzita, Brno, Česká republika²Katedra historie, Pedagogická fakulta, Masarykova univerzita,
Brno, Česká republika

Abstract

The identification of the individual phenotypic characteristics, most often the color of hair, eyes, and skin, applies both in forensic practice and in the research of ancient DNA. There are several types of approaches and protocols that can be applied according to the objectives and nature of the DNA to be investigated on the research sample.

The main aim was the introduction of a method for the detection of rs12913832 polymorphism of the *HERC2* gene, which is considered to be the strongest marker of the prediction of the eye color. Real-time PCR using a target-specific TaqMan[®] probe was used as it is the most suitable method for detecting polymorphism. This predesigned probe is characterized by a very short length of the sequence, making it ideal for research in ancient DNA. DNA sequences are often very short because of degradation and fragmentation. Allelic discrimination was chosen to detect the genotype.

For the analysis, the skeleton material from the burial site Znojmo-Hradiště (Great Moravia Age) was used. From the whole set of 20 samples, 19 of them were successfully analyzed and genotyped. None of the detected genotypes was identified as the homozygous TT, which is characteristic for very dark shades of eyes. In contrast, the heterozygous assembly was detected in most samples. A genotype of TC, which is common in individuals with brown or hazel eyes, was determined in 15 samples. The light shade and the corresponding CC genotype were then determined in 4 individuals.

Keywords: ancient DNA, phenotyping, real-time PCR, *HERC2*, rs12913832

Úvod

Určení viditelných fenotypových charakteristik z DNA (EVCs; z angl. *externally visible characteristics*) je součástí snah o rekonstrukci podoby osoby neznámého vzhledu. V oblasti výzkumu starobylé DNA (aDNA) se fenotypování uplatňuje nejčastěji jako doplněk antropologické rekonstrukce podoby podle lebky, jehož podoba předtím nebyla známá, nebo naopak jako

kontrola správnosti historických zdrojů a pramenů. Příkladem je analýza DNA Mikoláše Koperníka, která zahrnovala mimo jiné i určení barvy očí. Mikoláš Koperník byl na všech obrazech zobrazován jako tmavooký, analýza polymorfismu rs12913832 genu *HERC2* nicméně toto vyvrátila a potvrdila naopak světlé oči (Bogdanowitz *et al.*, 2010).

Fenotyp je definován jako pozorovatelný projev genotypu člověka, přičemž v rámci fenotypování se určují především EVCs různých barev a odstínů. Výsledný barevný fenotyp je determinován jednonukleotidovými polymorfismy (SNP) v genech ovlivňujících výsledný odstín a toho se využívá k určení výsledného fenotypu. Mezi typické a nejčastěji analyzované EVCs patří barvy očí, vlasů a kůže.

Dědičnost barvy očí bývá popisována jako mendelistická dědičnost s dominancí hnědé barvy nad zelenou a modrou a dominancí zelené nad modrou barvou (Hurst, 1908). Mendelisticky jsou však děděny pouze jednotlivé znaky (Redei, 2008). Zbarvení duhovky, svalu obklopujícího panenku a korigujícího množství světla vstupujícího panenkou do oka, je ovlivněno neúplnou dominancí a epistází více genů. Barva očí díky tomu může nabývat široké škály barev a odstínů hnědé, oříškové, zelené, modré a šedé. Za barvu očí jsou nejvýznamněji zodpovědné geny *HERC2* a *OCA2* a interakce mezi nimi. Ačkoliv je barva očí komplexním znakem, gen *HERC2* a konkrétně polymorfismus rs12913832 do velké míry udává, zda bude mít dotyčný světlé či tmavé oči, a usnadňuje tak predikci, ačkoliv protein sám do pigmentace nijak nezasahuje (Eiberg *et al.*, 2008). Naopak dochází k epistázi genů s genem *OCA2*, jehož promotor leží uvnitř genu *HERC2*. Při jednonukleotidové záměně v intronu 86 dochází ke změně vazebného místa pro transkripční faktory genu *OCA2* a tím k regulaci jeho exprese. Za přítomnosti tyminu se navážou transkripční faktory a společně s promotorem *OCA2* vytvoří chromatinovou smyčku, čímž zvýší expresi *OCA2* a tím i množství melaninu (Visser *et al.*, 2012). Dojde-li k záměně tyminu za cytosin, faktory se nenavážou, nevytvoří se smyčka a exprese *OCA2* je utlumena. Na fenotypu se to projeví jako změna barvy z tmavé na světlou. U homozygota pro T dochází k vyjádření velmi tmavé barvy, u homozygotní sestavy pro C je tomu naopak a oči mají světlé zbarvení. U heterozygotů se projeví odstíny jako světlejší hnědá, oříšková či zelená.

Cíl

Cílem práce bylo zavedení detekce polymorfismu rs12913832 v genu *HERC2* pro starobylou DNA.

Materiál

Znojmo-Hradiště, známé taky jako Hradiště sv. Hypolita, je velkomoravská lokalita nedaleko města Znojma. Hradiště bylo osídleno od paleolitu, příchod Slovanů je datován do 8. století. Největšího rozmachu dosáhlo Hradiště během 9. a první poloviny 10. století. Opevněné slovanské hradisko dosahující během velkomoravské doby rozlohy 20 hektarů představovalo významné centrum jihozápadní Moravy. Pohřebiště, které náleželo k hradisku, leželo jihozápadně od osady, a to vně opevnění. Objeveno bylo v roce 2007 při záchranném výzkumu na stavebním pozemku (Klíma, 2009). Od objevení do roku 2015, kdy archeologický výzkum probíhal, bylo odkryto více než 500 objektů, z nichž většinu představovaly hrobové jámy.

U několika jedinců z naleziště Znojmo-Hradiště byla provedena rekonstrukce podoby. Antropologická rekonstrukce podoby člověka je metoda využívající antropometrické body a místa na lebce k rekonstrukci možného vzhledu za života jedince. Jako

vědecká disciplína vznikla v 70. letech 20. století, významnou osobností v oboru byl Michail Gerasimov (1908–1970) (Novotný *et al.*, 2003). Pro rekonstrukci podoby byla zvolena metoda anatomická, jinak nazývaná jako ruská, celkem bylo zrekonstruováno 6 lebek (Vaničková, 2011).

Do analýzy byly zařazeny 4 zrekonstruované lebky, které byly v době analýzy k dispozici. Tyto lebky pochází z hrobů č. 467, 534, 541 a 583. Soubor byl doplněn jedinci se zachovalými lebky, u nichž je v budoucnu možná rekonstrukce podoby, a materiálem analyzovaným kolegy z Laboratoře biologické a molekulární antropologie (LGMD) v rámci jiných projektů. Celkem byla analyzována DNA 11 mužů a 9 žen z pohřebiště Znojmo-Hradiště, pohlaví bylo určeno antropologickými a genetickými metodami.

Metodika

Jako materiál pro izolaci DNA byly použity zuby, které byly rozemlety na kulovém mlýnu. DNA byla izolována zavedeným protokolem, který vychází z publikací Yanga *et al.* (1998) a Anderunga *et al.* (2008). Kvantifikace aDNA byla provedena podle

Tabulka 1. Souhrn výsledků. Celkem byla analyzována aDNA 20 jedinců ze Znojma-Hradiště. Pohlaví i genotyp polymorfismu rs12913832 genu *HERC2* bylo stanoven u 19 vzorků.

| Číslo hrobu | Pohlaví stanoveno geneticky | Detekce rs12913832 |
|-------------|-----------------------------|--------------------|
| 436 | muž | TC |
| 437 | muž | CC |
| 448 | muž | TC |
| 467 | nelze určit | nelze určit |
| 483 | žena | TC |
| 484 | muž | TC |
| 502 | žena | TC |
| 503 | žena | TC |
| 509 | žena | TC |
| 514 | muž | TC |
| 515 | muž | TC |
| 522 | muž | TC |
| 534 | muž | CC |
| 539 | žena | TC |
| 541 | muž | CC |
| 583 | muž | CC |
| 598 | muž | TC |
| 618H | žena | TC |
| 618S | žena | TC |
| 644 | žena | TC |

Diskuze

Z detekovaných genotypů nebyl jediný určen homozygot TT, dominantní sestava pro determinaci velmi tmavých odstínů očí. Naopak heterozygotní sestava byla detekována u většiny vzorků. Celkem u 15 vzorků byl stanoven genotyp TC, který je běžný u jedinců s hnědými či oříškovými očima. Světlý odstín a jemu příslušný genotyp CC byl pak determinován u 4 jedinců.

U mužů se genotyp TC pro oříškovou barvu vyskytl u 7 jedinců. U 4 z nich to byl genotyp CC, tito jedinci tedy mohli být světlí. V souboru žen byla úspěšně analyzována DNA 8 žen, pro všechny byl určen genotyp TC, tedy oříškové či zelené oči. Jeden vzorek DNA, číslo 467, nebylo možné geneticky určit, pravděpodobně kvůli přítomnosti inhibitorů v izolátu DNA.

O obyvatelích Velkomoravské říše se ve svých zápisech z let 965–966 zmiňuje arabský cestovatel a obchodník Abraham ben Jacob, který tyto populace popisuje jako “tmavší celkové vzezření včetně vlasů, zatímco výskyt světlých a světlých je výjimečnější” (Kowalski, 1946). Soubor analyzovaný v této práci

manuálu ke kitu Investigator Quantiplex HYres Kit (Qiagen). K detekci SNP rs12913832 genu *HERC2* byla použita fluorescenčně značená sonda TaqMan® (ThermoFisher) a přístroj 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems). Po celou dobu práce byla zachovávána přísná antikontaminační opatření LGMD (Brzobohatá, 2018).

Jako pozitivní kontrola pro real-time PCR reakce byla použita recentní DNA známého původu. Tato DNA pocházela od dobrovolníků, od nichž byl odebrán bukalní stěr. Vše bylo zastřešeno informovaným souhlasem, jehož kopii každý z dobrovolníků obdržel.

Výsledky

Výsledky jsou souhrnně uvedeny v tabulce 1. Možné genotypy pro analyzovaný polymorfismus jsou tři. Homozygotní sestava TT, která je typická u lidí s tmavými očima, se v souboru nevyskytuje. Genotyp TC se vyskytuje u jedinců se zelenými, oříškovými a světle hnědými očima, naopak genotyp CC vykazuje korelaci s modrou barvou a dalšími světlými odstíny.

není dostatečně velký pro populační zhodnocení, trend převažující hnědookosti je však zřetelný. Zároveň je ale patrné rozšíření alely C v polymorfismu rs12913832. Tato mutace vznikla někdy před 6–10 000 lety kolem Černého moře (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994) a pro její rozšíření bylo zapotřebí několik faktorů. Teorie nejčastěji mluví o rozšíření na základě pohlavního výběru, neboť modrá barva byla vzácná a tím atraktivnější, a dále o pozitivní selekci světlého fenotypu směrem na sever Evropy kvůli nedostatku slunečního světla (Myant *et al.*, 1997). V dnešní české populaci je světlá barva zastoupena ze 40 % (Švábová, 2012). Pozorovaný trend zastoupení heterozygotů v populaci zapadá do teorie postupného rozšiřování této recesivní alely.

Závěr

Genotypizace a fenotypizace DNA jedinců neznámého vzhledu jsou čím dál oblíbenějším tématem k realizaci ve výzkumu starobylé DNA. U slovanských populací je však tato oblast v odborných kruzích a literatuře stále opomíjena. Získané

výsledky publikované v této práci jsou proto ojedinělé, přispívají k vědění, jaké už o Slovanech existuje, a mohou ukázat směr do budoucna. Výše zmíněná analýza poukazuje na možnost použití této metody pro aDNA a možné rozšíření projektu o další cílová polymorfni místa determinující barvu očí či dalších charakteristik, optimalizaci a zavedení rozsáhlejšího protokolu pro fenotypování v laboratořích LMBA.

Poděkování

Článek vznikl s podporou specifického výzkumu ÚEB PŘF MU.

Souhrn

Určení fenotypových charakteristik jedince jako je barva vlasů, očí a kůže nachází ve forenzní genetice i výzkumu aDNA. Hlavním cílem bylo zavedení metody pro detekci polymorfismu rs12913832 genu *HERC2*, který je považován za nejsilnější marker predikce odstínu barvy očí. Metodicky byla zvolena analýza pomocí real-time PCR s použitím cílově specifické TaqMan[®] sondy a k detekci genotypu byla zvolena alelová diskriminace.

Byla analyzována aDNA v souboru 20 kostér z pohřebiště Znojmo-Hradiště, u 4 jedinců byla provedena antropologická rekonstrukce podoby. Genotyp byl úspěšně detekován u 19 vzorků. Z detekovaných genotypů nebyl jediný určen jako homozygot TT, dominantní sestava pro determinaci velmi tmavých odstínů očí. Naopak heterozygotní sestava byla detekována u většiny vzorků. Celkem u 15 vzorků byl stanoven genotyp TC, který je běžný u jedinců s hnědými či oříškovými očima. Světlý odstín a jemu příslušný genotyp CC byl pak determinován u 4 jedinců. U těch, pro které existuje rekonstrukce podoby, byl determinován genotyp CC ve třech případech, aDNA ženy z hrobu 467 nebylo možné zanalyzovat.

Klíčová slova: starobylá DNA, fenotypování, real-time PCR, *HERC2*, rs12913832

Literatura

- Anderung, C., Persson, P., Bouwman, A., Elburg, R., & Götherström, A. (2008). Fishing for ancient DNA. *Forensic Science International: Genetics*, 2: 104–107.
- Bogdanowicz, W., Allen, M., Branicki, W., Lembring, M., Gajewska, M., & Kupiec, T. (2009). Genetic identification of putative remains of the famous astronomer Nicolaus Copernicus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(30), pp.12279–12282.
- Brzobohatá, K. (2018). *Antropogenetický výzkum slovanské populace ze Znojma-Hradiště*. Disertační práce. Masarykova univerzita, Brno. Přírodovědecká fakulta.
- Cavalli-Sforza, L., Menozzi, P., Piazza, A. (1994). *The history and geography of human genes*. Princeton, N.J.: Princeton University Press.
- Eiberg, H., Troelsen, J., Nielsen, M., Mikkelsen, A., Møgel-From, J., Kjaer, K., & Hansen, L. (2008). Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the *HERC2* gene inhibiting *OCA2* expression. *Human Genetics*, 123(2), pp.177–187.
- Hurst, C. (1908). On the Inheritance of Eye-Colour in Man. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 80(537), 85–96. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/80088>
- Klíma, B. (2009). Jedinečný archeologický objev na Hradišti sv. Hypolita ve Znojmě. *Sborník prací PdF MU, řada společenských věd* č. 23. Brno: MU, s.
- Kowalski, T. (1946). Relacja Ibrāhīma Ibn Ja'kūba z podróży do krajów słowiańskich w przekazie Al-Bekriego. wyd., wstępem, koment. i przekł. opatrzył Tadeusz Kowalski

- przy współud. J. Kostrzewskiego [et al.]. Kraków : skł. gł. w Księgarniach Gebethnera i Wolffa. [5], 162, 12 s. *Pomniki Dziejowe Polski Seria 2* ; t. 1
- Myant, N. B., Fobes, S. A., Day, I. N. M., & Gallagher, J. (1997). Estimation of the age of Ancestral Arginine3500 → Glutamine mutation in Human ApoB-100. *Genomic* 45:78–87
- Novotný, V., Králík, M., Malá, P., & Kotrla, J. (2003). Tvář i tvář našim předkům. *(Re)konstrukce a experiment v archeologii* 4, 53–69.
- Redei, G. (2008). *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics*, 3rd edn (Springer, New York City, NY, 2008)
- Švábová, V. (2012). *Barva očí brněnských vysokoškoláků*. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Brno. Přírodovědecká fakulta.
- Vaničková, E. (2011). Antropologická rekonstrukce podoby člověka podle lebky z pohřebiště Znojmo-Hradiště. In Bilek Libor, Kováčik Josef. *Šestnáct příspěvků k dějinám (Velké) Moravy*. Sborník k narozeninám Bohuslava F. Klímy. Brno: Masarykova univerzita, 2011. s. 59–62, 11 s. ISBN 978-80-210-5575-9.
- Visser, M., Kayser, M., & Palstra, R. (2012). *HERC2* rs12913832 modulates human pigmentation by attenuating chromatin-loop formation between a long-range enhancer and the *OCA2* promoter. *Genome Research*, 22(3), pp.446–455.
- Yang, D. Y., Eng, B., Wayne, J. S., Dudar, J. C., & Saunders, S. R. (1998). Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *American journal of physical anthropology*, 105: 539–543.

- Lysáková, P., Brzobohatá, K., Drozdová, E., & Klíma, B. (2018). Genetické určení barvy očí u jedinců z pohřebiště Znojmo-Hradiště. *Česká antropologie*, 68(1–2), 4–6.