

SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO- MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

GENOM NEANDERTALACA
THE NEANDERTAL GENOME

SEMINARSKI RAD

Lea Langer

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: prof.dr.sc. Višnja Besendorfer

Zagreb, 2012

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. POVIJEST NEANDERTALACA	2
2.1. Neandertalac (<i>Homo neanderthalensis</i>)	2
2.2. Kronologija pronalazaka i istraživanja na vrsti <i>Homo neanderthalensis</i> .	2
3. ISTRAŽIVANJE DREVNE DNA	4
3.1. Kontaminacija drevne DNA.....	4
3.2. Degradacija drevne DNA.....	4
4. USPOREDBA GENOMA NEANDERTALACA I MODERNOG OVJEKA	6
4.1. Uzorci korišteni u sekvenciranju genoma neandertalaca	6
4.2. Protok gena.....	7
4.3. Geni karakteristični za ljudski genom	8
4.4. Geni pod utjecajem pozitivne selekcije	9
4.5. Određivanje razdvajanja neandertalaca i modernih ljudi	10
5. ZAKLJUČAK.....	11
7. SAŽETAK.....	13
8. SUMMARY.....	14

1. UVOD

„Usporedba genomske sekvence neandertalaca te genomske sekvence modernog ovjeka omogućuje nam da definiramo u čemu se naš genom razlikuje od naših najbližih evolucijskih srodnika.“ (Svante Pääbo, priloga eno prema Max Planck Society, *The Neandertal in us*, 2010).

Samo 10 godina nakon sekvenciranja genoma ovjeka (*Homo sapiens*) znanstvenici su uspjeli ponoviti uspjeh na izumrloj vrsti *Homo neandertalensis*. Da bi bolje razumjeli važno razdoblje u evoluciji ovjeka od vremena kada se on odvojio od evolucijskih srodnika neandertalaca, uspoređivao se katalog onih gena koji su prošli kroz bitne evolucijske prilagodbe te tako obilježili razvoj modernog ovjeka.

Genom neandertalca nam također otkriva da li je u evolucijskoj povijesti modernog ovjeka došlo do križanja s neandertalcima, što je prije bilo nemoguće utvrditi iz fosilnih ostataka i arheološke ostavštine.

2. POVIJEST NEANDERTALACA

2.1. Neandertalac (*Homo neanderthalensis*)

Neandertalac (*Homo neanderthalensis*), izumrla vrsta roda *Homo*, razvio se iz vrste *Homo antecessor* koja je ujedno i zajednički predak anatomski modernom ovjeku (*Homo sapiens sapiens*) (Janković i Karavani, 2009). Prve morfološke značajke tipične za neandertalsku vrstu pojavljuju se u Europi prije 400 000 godina, dok se konačne anatomske odlike razvijaju do prije 130 000 godina. Neandertalske lubanje su niske, izduženog oblika te kranijalnog kapaciteta 1520 cm³ (Janković i Karavani, 2009, prema Holloway, 1985). Središnja regija lica je vrlo izbočena, a nosna šupljina i očne duplje velikih dimenzija. Nakon što su se razvili na tlu Europe, dio neandertalskih skupina širi se na veće geografsko područje Bliskog istoka te dijela azijskog kontinenta (Karavani, 2006).

Evolucija anatomski modernih ljudi odvijala se na tlu Afrike te Levanta, odakle su prije 40 000 godina migrirali u Europu. Dok jedna grupa znanstvenika smatra da su anatomski moderni ljudi potpuno i bez miješanja zamijenili neandertalske starosjedioce, druga grupa znanstvenika smatra da je prilikom njihovog susreta došlo do kulturnog i biološkog miješanja (Janković i Karavani, 2009).

2.2. Kronologija pronalazaka i istraživanja na vrsti *Homo neanderthalensis*

Prvi fosili neandertalaca (*Homo neanderthalensis*) otkriveni su 1856. godine u Maloj špilji Feldhofer u dolini Neander (Janković i Karavani, 2009). Ubrzo nakon tog otkrića dolazi do pronalazaka neandertalskih fosila u mnogim europskim zemljama.

Njihovi nalazi otkriveni su u dijelu Azije. Posebno važna nalazišta su Shanidar u Iraku, Amud, Kebara i Tabun u Israelu (Janković i Karavani, 2009; prema Trinkaus, 1983, Rak i sur., 1994, Akazawa i sur., 1998).

U istraživanju genoma neandertalaca od posebnog su značaja nalazi pronađeni na lokalitetu špilje Vindije u sjeverozapadnoj Hrvatskoj, koji su datirani između 45 000 i 30 000 godina (Janković i Karavani, 2009).

Do napretka u istraživanjima na molekularnoj razini dolazi u posljednjih trinaest godina kada je prvi puta djelomično sekvencirana prva mitohondrijska DNA. Od tada pa do danas kreće nagli razvoj tog područja istraživanja. U Tablici 1. vidljiv je kronološki redoslijed važnijih događaja u povijesti istraživanja neandertalaca, koji će detaljnije biti objašnjeni u radu.

Tablica 1. Kronologija pronalazaka i istraživanja vrste *Homo neandertalensis* (prilagođeno prema <http://www.sciencemag.org/site/special/neandertal/feature/index.html>)

Godina	Događaj
1829	prvi pronađeni, no ne i prepoznati fosil neandertalaca, Engis
1848	lubanja neandertalaca, neprepoznata, Gibraltar
1856	"Neandertal 1", starost 40000, Kleine Feldhofer Grotte, dolina Neander
1864	imenovanje vrste <i>Homo neanderthalensis</i>
1886	pronađena 2 cjelovita kostura, špilja Spy
1908	cjeloviti kostur, La Chapelle-aux-Saints, J. Francuska
1909	najveća lubanja, La Ferrassie, J. Francuska
1930-1932	kostur pronađen izvan Europe, Israel
1953-1957	kosturi pronađeni u špilji Shanidar, Irak
1979	kostur pronađen u Saint-Cesaire, Z. Francuska
1983	kostur pronađen u špilji Kebara, Israel
1987-1991	moderni ljudi na području Levanta ne mogu potjecati od neandertalaca
1997	sekvencirana prva mitohondrijska DNA (~400pb)
2000	sekvencirana druga mitohondrijska DNA
2006	djelomično sekvencirana jezgrina DNA
2007	neandertalci i moderni ljudi dijele istu varijantu gena FOXP2
2008	sekvenciran kompletan mitohondrijski genom
2009	popravak i analiza 5 neandertalskih mtDNA
2010	3 podgrupe neandertalaca obitavale su na području Z i J Europe te Z Azije
2010	sekvenciran genom neandertalaca

3. ISTRAŽIVANJE DREVNE DNA

Budu i da drevna DNA degradira tijekom godina, potrebno je obnavljanje njenih sekvenci kako bi se dobile informacije o davno izumrlom organizmu. Kada je DNA pohranjena u fosilnim ostatcima, osim što je degradirana na manje fragmente, u njoj su esto prisutna kemijska ošte enja koja mogu uzrokovati pogrešnu determinaciju sekvence.

S obzirom na sli nosti u sekvenci drevne DNA neandertalaca sa genomom modernog ovjeka, mogu e su poteško e pri identifikaciji drevne DNA te tako i njenog razlikovanja od genoma modernog ovjeka.

3.1. Kontaminacija drevne DNA

Da bi rezultati sekvenciranja genoma bili što vjerodostojniji potrebno je smanjiti kontaminaciju drevne DNA. Jedna od metoda je pove anje omjera neandertalske DNA u odnosu na stranu DNA identificiranjem restrikcijskih enzima koji režu primjerice samo bakterijsku DNA, te se zatim definiranim restrikcijskim enzimima tretira genomski katalog (Green i sur., 2010).

Tako er se uvode *Clean-room* uvjeti rada gdje se maksimalno smanjuje mogu nost kontaminacije tijekom izolacije i sekvenciranja drevne DNA. Dodaju se i specifi ne vezne (*tag*) sekvence na molekulu drevne DNA što omogu uje identificiranje strane DNA te determiniranje 4 bilijuna bp genoma neandertalca.

3.2. Degradacija drevne DNA

Budu i da tijekom godina dolazi do degradacije drevne DNA, korišteni su novi pristupi koji omogu uju obnovu dijelova izoliranih genomskih sekvenci. To je metoda visoke propusnosti sekvenciranja DNA (*high-throughput sequencing*) za dobivanje sekvencijskih podataka izravno iz izolirane DNA bez prethodnog poja avanja te metoda metagenomske analize kompleksnih mješavina DNA (Noonan i sur., 2006).

Metagenomski katalog omogućuje imortalizaciju DNA izoliranu iz vrijednih drevnih uzoraka, te se na taj način izbjegava nepotrebna ekstrakcija. Jednom kada se drevna DNA klonira u metagenomski katalog može se razlikovati od kontaminacija koje mogu biti uvedene tijekom amplifikacije DNA te sekvenciranjem pomoću vektorskih sekvenci. Za dobivanje metagenomskog kataloga Noonan i sur., (2006) koristili su DNA izoliranu iz jedinke stare 38 000 godina sa nalazišta Vindija, Hrvatska. Iz kataloga je obnovljeno 65 250 pb, veina pomoću pirosekvenciranja, dok je manji dio obnovljen metodom sekvenciranja po Sanger-u. Također je katalog služio za izolaciju specifičnih neandertalskih sekvenci direktnom selekcijom (Noonan i sur., 2006).

Pirosekvenciranje DNA kalupa daje nekoliko stotina tisuća sekvenci, no veća je stopa pogrešaka nego kod sekvenciranja po Sanger-u, te je duljina same DNA koja se može očitati iz jedne sekvence kraćaa (Green i sur., 2010). Kod sekvenciranja genoma taj problem je riješen spajanjem kratkih sekvenci upotrebom poredbenih algoritama te usporedbom sa sekvencamaimpanze i čovjeka (Green i sur., 2010).

Za obnavljanje genoma od interesa, a koji se zbog kontaminacija ne može sekvencirati koriste se DNA- i tehnologija (*DNA microarray*), metoda koju su koristili Burbano i sur., (2010) da bi sekvencirali oko 14 000 protein-kodirajućih regija za koje se smatra da su se promijenile u evolucijskoj liniji čovjeka, od posljednjeg zajedničkog pretka kojeg dijelimo saimpanzama. DNA- i predstavlja tvrdu površinu na koju se različitim načinima printaju sonde koje se kasnije u procesu hibridizacije vežu sa fluorescentno obilježenim metama, a rezultati se očitavaju te obrađuju u određenom programu.

4. USPOREDBA GENOMA NEANDERTALACA I MODERNOG OVJEKA

Usporedba genoma neandertalaca i modernog ovjeka daje podatke o promjenama u genomu koje su se dogodile prije i poslije razdvajanja modernog ovjeka i neandertalaca od zajedničkog pretka.

4.1. Uzorci korišteni u sekvenciranju genoma neandertalaca

Green i sur. (2010) uzeli su 21 uzorak kosti neandertalaca koje su bile od male morfološke vrijednosti. Uzorke su testirali na prisutnost mtDNA umnažanjem pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR) te izabrali ukupno 3 uzorka: uzorak 1- kost Vi33.16 uzeta iz stratigrafskog sloja G3, starost 38 000 godina, uzorak 2 - kost Vi33.25 uzeta iz stratigrafskog sloja I, nije datirana i uzorak 3 - kost Vi33.26 uzeta iz sloja G, starost 44 500 godina (Slika 1.), od kojih je determinirano da su uzorci 1 i 2 iz različitih jedinki dok je uzorak 3 u srodstvu sa uzorkom 1. Svi uzorci su ženskog spola.



Slika 1. Uzorci kostiju uzeti iz špilje Vindija (preuzeto iz Green i sur., 2010)

Da bi se napravila usporedba genoma neandertalaca te modernog ovjeka sekvenciran je genom petero ljudi iz različitih dijelova svijeta: Južne Afrike, Zapadne Afrike, Nove Gvineje,

Kine i Francuske. Te sekvence su uspoređene s genomom impanze te neandertalaca. Sekvence su analizirane na taj način da su tražene specifične regije koje postoje u današnjem ovjeka ali ih nema u neandertalaca te regije koje pokazuju visoku učestalost izvedenih, odnosno nedavno evoluiranih sekvenci. Te regije ukazuju na prisutnost mutacija koje su postale fiksirane nakon što je došlo do razdvajanja ovjeka i neandertalaca (Green i sur., 2010)

U znanstvenom radu, Green i sur. (2010) istraživali su neandertalsku DNA na mjestima u genomu gdje je došlo do nesinonimnih supstitucija nukleotida u evolucijskoj liniji ovjeka, nakon što se on odvojio od impanzi. Za svaku supstituciju koja je fiksirana, odnosno koja se pojavljuje u današnjih ljudi nemoguće je odrediti kada je došlo do prvotne mutacije ili fiksacije. Utvrđivanjem tih pozicija kod neandertalaca, fiksirane supstitucije u modernog ovjeka mogu se podijeliti u dvije grupe; mjesta koja indiciraju da je došlo do supstitucije prije razdvajanja od modernih ljudi i neandertalaca, te mjesta koja indiciraju da se fiksacija supstitucije u modernih ljudi dogodila nakon razdvajanja od neandertalaca.

4.2. Protok gena

Za određivanje protoka gena koristili su SNP-ove (*Single nucleotide polymorphism*) odnosno polimorfizam koji uključuje promjenu samo jednog nukleotida. Kada su usporedili jedinku neandertalca s Europljaninom i Azijatom otkrili su da neandertalac uvijek dijeli jednaku količinu nedavno evoluiranog SNP-ova.

Kada su usporedili jedinku neandertalaca s jedinkom porijeklom iz Afrike te Europe, odnosno Azije, neandertalac je dijelio više SNP-ova s Europljaninom ili Azijatom nego s jedinkom iz Afrike. Razlog tome je međusobno križanje neandertalaca sa precima Europljana i Azijata. Također je neandertalac dijelio više SNP-ova s jedinkom iz Nove Gvineje što je za ujediniće budući da neandertalac nije obitavao na tom području te nije moglo doći do križanja. Pretpostavlja se da je razlog tome protok gena između neandertalaca te predaka neafričkih populacija na području Srednjeg Istoka prije nego je došlo do rasprostranjivanja europskih populacija na područje Istočne Azije prije 100 000 – 50 000 godina.

Da bi sa sigurnošću dokazali protok gena Green i sur. (2010) radili su dodatna istraživanja, u kojima su koristili genom Afroamerikanca objavljenog u *Projektu ljudskog*

genoma, te usporedili regije genoma afričkog i europskog podrijetla sa regijama u genomu neandertalaca. Usporedbom je dobiveno da su u genomu Afroamerikanca segmenti europskog i neandertalskog podrijetla međusobno sličniji nego što je ijedan od njih sličniji segmentu podrijetlom iz Afrike. Matematičkim modelom protoka gena pokazano je da je 1-4 % genoma ljudi na euroazijskom području neandertalskog podrijetla.

činjenica da je došlo do međusobnog križanja dovodi u sumnju teoriju o evoluciji suvremenih ljudi prema modelu „Out of Africa“. Prema tom modelu anatomske moderni ljudi su se razvili unutar jedinstvene regije (populacije), nakon čega se šire i postupno zamjenjuju sve starosjedilačke populacije u ostalim geografskim područjima (Janković i Karavani, 2009).

4.3. Geni karakteristični za ljudski genom

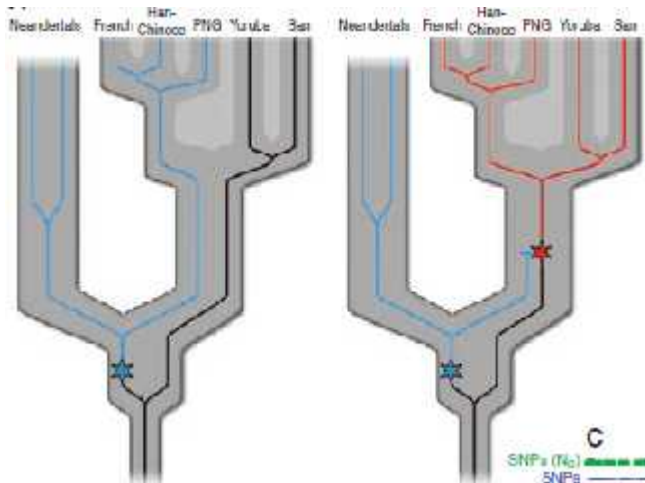
Genom neandertalaca također nam omogućuje identifikaciju osobina koje su fiksirane, tj. karakteristične za današnjeg čovjeka, a ne za hominine. Od posebnog interesa su one osobine koje su nastale iz određenog funkcionalnog razloga. U tu svrhu identificiraju se mjesta gdje se sekvence genoma čovjeka razlikuju od šimpanze i orangutana jer je za njih vrlo vjerojatno da su se promijenile u evolucijskoj liniji čovjeka nakon razdvajanja od zajedničkog pretka s šimpanzama.

Pronađeno je 78 nukleotidnih supstitucija koje su promijenile sposobnost gena za kodiranje proteina. Dakle, došlo je do relativno malo promjena ukoliko se gleda na cjelokupni genom od 3 milijuna baza te ako se uzme u obzir da je vremenski period 300 000 godina.

Pronađeno je samo nekoliko gena sa više od jedne supstitucije; gen SPAG17 koji kodira protein važan za stvaranje aksoneme, strukture važne za pokretanje flageluma spermija, gen PCD16 koji kodira za fibroblast kadherin-1, molekulu koja je uključena u zacjeljivanje rana, gen TTF1 - terminacijski faktor transkripcije (regulira transkripciju ribosomskih gena), gen CAN15 - kodira protein nepoznate funkcije, gen RPTN - kodira za repetin, izvanstanični epidermalni protein matriksa i TRPM1 - gen koji kodira melastatin koji je važan za održavanje pigmentacije kože.

4.4. Geni pod utjecajem pozitivne selekcije

Također koristeći pristupom postojećoj bazi SNP-ova, identificirano je 212 regija pod utjecajem pozitivne selekcije, gdje je regija s najjačim signalom sadržavala 293 uzastopnih SNP pozicija u prvoj polovici gena AUTS2, dok su u neandertalcau oni samo ancestralni aleli (Slika 3.).

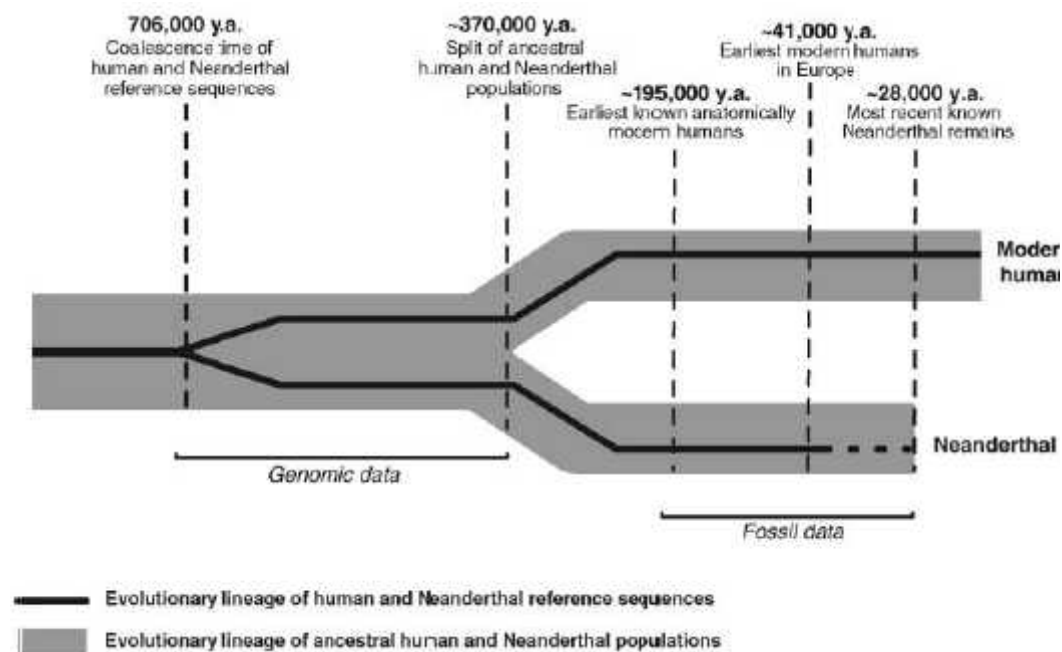


Slika 3. Usporedba jedinka neandertalaca s 5 jedinki modernog svijeta. Plava linija prikazuje nedavno evoluirani alel, crvena prikazuje fiksaciju alela

Od dobivenih 212 regija izdvojeno je 20 regija na koje djeluje pozitivna selekcija. Kod 5 od 20 regija ne radi se o protein-kodirajućim genima već o strukturnim i regulatornim elementima koji se nalaze pod utjecajem pozitivne selekcije. Ostalih 15 regija sadrži 1 do 12 gena. Najveća regija je smještena na kromosomu 2 te sadrži gen THADA koji utječe na energetske aspekte metabolizma u ranih modernih ljudi. Gen DYRK1A je važan u kognitivnom razvoju, njegova mutacija je jedan od uzroka Downovog sindroma. Gen NRG3 se povezuje sa shizofrenijom. Gen CADPS2 te gen AUTS2, ukoliko su mutirani, uzrokuju autizam koji onemogućuje socijalne te kulturne aspekte u razvoju. Navedeni geni su uključeni u kognitivni razvoj te su zbog velike evolucijske važnosti za razvoj modernog svijeta pozitivno selektirani. Gen RUNX2 (CBFA1) je jedini gen u genomu za kojeg se zna da uzrokuje kleidokranijalnu displaziju. Evolucijske promjene u tom genu utječu na morfologiju lubanje te gornjeg dijela tijela po kojima se moderni ljudi razlikuju od neandertalaca te drugih ranih hominina.

4.5. Određivanje razdvajanja neandertalaca i modernih ljudi

Razdvajanje neandertalaca i modernih ljudi je trenutak kada su te dvije populacije posljednji put izmijenile gene, te je ona recentnija od razdvajanja DNA sekvence. Vrijeme razdvajanja se može zaključiti iz učestalosti alela SNP otkrivenih u jednoj populaciji koji se također mogu pronaći u drugoj populaciji. Razlog tome je to da što je razdvajanje populacija starije, veća je vjerojatnost da su nedavno evoluirani aleli pronađeni u jednoj populaciji podložniji novim mutacijama. Da bi se odredili izvorni geni uspoređivane su transverzije SNP-a jedinke čovjeka iz zapadne Afrike s genomom šimpanza i orangutana. Ukoliko se uzme podatak da se razdvajanje DNA čovjeka i šimpanze dogodilo između 5,6 te 8,6 milijuna godina, to sugerira da je do odvajanja sadašnjeg čovjeka i neandertalca došlo prije 270 000-440 000 godina.



Slika 4. Vrijeme razdvajanja genoma neandertalaca i modernog čovjeka, te razdvajanje predaka modernog čovjeka i neandertalaca

5. ZAKLJUČAK

Najnovije istraživanje Green i sur. (2010) pokazalo je da je moguće sekvencirati te obnoviti sekvence koje su degradirale tijekom godina. Analiza genoma dovela je do nekoliko važnih otkrića bitnih ne samo za evoluciju neandertalaca već i za evoluciju modernog čovjeka. Da bi shvatili koji geni su doprinijeli razvoju modernog čovjeka bilo je potrebno usporediti naš genom s našim najbližim srodnikom. Analiza genoma uključila je 3 bilijuna nukleotida iz uzoraka triju kosti sakupljenih na području Hrvatske, Vindija, starosti 38 000 godina. Usporedba genoma neandertalaca s genomom 5 osoba iz različitih dijelova svijeta dovela je do nekoliko zaključaka.

Europljani i Azijati dijele 1-4% genoma s neandertalcima dok Afrikanci ne dijele, što govori u prilog teoriji da je došlo do križanja između tadašnjih populacija. Iako je došlo do križanja, sama uloga neandertalaca u razvoju modernog čovjeka je izrazito mala kada se sagleda cijeli genom čovjeka.

Ne očekivan rezultat je bio također postojanje sekvenci u genomu sadašnjeg čovjeka na području Nove Gvineje, što ukazuje da je došlo do protoka gena prije nego se dogodilo razdvajanje populacija Europljana i Azijata.

Iako moderan čovjek dijeli s neandertalcem 99,84% genoma postoje geni koji su postali fiksirani pozitivnom selekcijom u modernog čovjeka nakon odvajanja od neandertalaca prije 270 000 do 440 000 godina. Pronađeno je 212 regija sa promjenama u sekvencijama u kojima je 20 regija sa genima koji su uključeni u kognitivni razvoj čovjeka, u morfologiju lubanje, u metabolizam, morfologiju te fiziologiju kože, te geni koji kodiraju za regulatorne proteine. Budući da je genom neandertalaca tek nedavno sekvenciran, to je samo početak daljnjih istraživanja koja bi trebala razviti nove hipoteze te dati širi uvid u podrijetlo i ranu povijest modernih ljudi.

6. LITERATURA

1. Boyd, R., Silk, J.B., 2003. From Hominid to Homo., Homo sapiens and the Evolution of Modern Human Behavior. U: How Humans Evolved. 3rd ed. W.W. Norton and Company, New York , 339- 409
2. Briggs, A.W., *et al.*, 2007. Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *PNAS* **37**, 14616- 14621.
3. Burbano, H.A., *et al.*, 2010. Targeted Investigation of the Neandertal Genome by Array-Based Sequence Capture. *Science* **328**, 723- 725.
4. Green, R.E., *et al.*, 2009. The Neandertal genome and ancient DNA authenticity. *The EMBO Journal* **28**, 2494- 2502.
5. Green, R.E., *et al.*, 2010. A Draft Sequence of the Neandertal Genome. *Science* **328**, 710- 722.
6. Green, R. E., Kircher, M., Stenzel, U., 2010. Supplemental Online Material 3, [http://www.sciencemag.org/content/suppl/2010/05/05/328.5979.710.DC1/Green_SO M.pdf](http://www.sciencemag.org/content/suppl/2010/05/05/328.5979.710.DC1/Green_SO_M.pdf)
7. Jankovi ,I., Karavani I., 2009. Osvit ovje anstva, Školska knjiga, Zagreb
8. Noonan, J.P., *et al.*, 2006. Sequencing and Analysis of Neanderthal Genomic DNA. *Science* **314**, 1113- 1118.
9. <http://www.sciencemag.org/site/special/neandertal/feature/index.html>

7. SAŽETAK

Neandertalac (*Homo neanderthalensis*) se razvio iz vrste *Homo antecessor* koja je i zajednički predak anatomske moderne čovjeku (*Homo sapiens sapiens*). Analizom genoma neandertalaca iz uzoraka triju kosti sa područja špilja Vindija, starosti 38 000 godina dobivena je sekvenca od više od 3 milijuna nukleotida koja je uspoređena sa genomom 5 osoba iz različitih dijelova svijeta. Rezultati ukazuju da Europljani i Azijati dijele 1-4% genoma s neandertalcima dok Afrikanci ne dijele što ide u prilog tezi da je došlo do križanja između ranih anatomske modernih ljudi i neandertalaca nakon što su moderni ljudi napustili Afriku, ali prije nego što su naselili Aziju i Europu. Također je utvrđeno da moderan čovjek dijeli s neandertalcem 99,84% genoma, no postoje geni koji su u modernog čovjeka fiksirani pozitivnom selekcijom nakon odvajanja od neandertalaca. U sekvenci je pronađeno 212 regija sa promjenama gena u kojima su regije sa genima koji sudjeluju u kognitivnom razvoju čovjeka, morfologiji lubanje, metabolizmu, morfologiji i fiziologiji kože, te geni koji kodiraju za regulatorne proteine. Da bi analiza drevne DNA bila uspješna potrebno je smanjiti kontaminaciju uzoraka, zbog čega su uvedeni „clean room“ uvjeti rada. Također se koristi metoda visoke propusnosti sekvenciranja DNA (*high-throughput sequencing*) i metoda metagenomske analize kompleksnih mješavina DNA koje omogućuju obnovu dijelova izoliranih genomskih sekvenci budući da je drevna DNA tijekom godina degradira. Za obnavljanje dijela genoma koji se zbog kontaminacija ne može sekvencirati koristi se DNA-mikroip tehnologija (*DNA microarray*).

8. SUMMARY

Neandertal (*Homo neanderthalensis*) was developed from the species *Homo antecessor*, which is also the common ancestor of anatomically modern humans (*Homo sapiens sapiens*). The analysis of Neandertal genome from three bone samples aged 38 000 years, from the area Vindija Cave, gave a sequence of more than 3 billion nucleotides which was compared with a genome of 5 people from different parts of the world. The results suggest that Europeans and Asians share 1-4% of the genome with Neandertals while Africans do not share, this supports the thesis that there was interbreeding between early anatomically modern humans and Neandertals after modern humans left Africa, but before they spread into Asia and Europe. It is also observed that modern human share 99,84% genome with Neandertal genome, but there are genes that are fixed in the modern human by positive selection after separation from Neandertals. In the sequence there was found 212 regions with changes including regions with genes involved in human cognitive development, skull morphology, metabolism, morphology and physiology of the skin, and the genes that encode for regulatory proteins. To make the analysis of ancient DNA successful it is necessary to reduce the contamination of the samples, introducing "clean room" conditions. It is also necessary to use the method of high-throughput DNA sequencing and metagenomic analysis of complex DNA mixtures that enable the recovery of isolated genomic sequences, since the ancient DNA degrades over the years. And in order to recover information about specific regions of interest, which cannot be used due to contamination, the DNA microarray approach is used.