

Древняя ДНК Европы. Средний палеолит (неандертальцы).

[Олег Балановский](#)

Фрагмент из книги "Генофонд Европы"

При исследованиях генофонда в явном или скрытом виде всегда присутствует время. В явном – когда речь идет об истории формирования генофонда, а в скрытом – при каждом виде анализа, ведь воздействие на генофонд любого фактора происходит во времени и обычно измеряется поколениями. Для отечественной геногеографии традиционной стала идея Элизе Реклю, что «География является Историей во времени», и анализ пространственной структуры генофонда рассматривается как ключ к реконструкции динамики генофонда во времени [Рычков, Ящук, 1986; Балановская, Рычков, 1990; Рычков и др., 1997]. Этот подход, хотя специально и не формулируемый, свойственен и многим зарубежным исследованиям [Cavalli-Sforza et al., 1994; Semino et al., 2000 и множество других работ]. Такой путь к реконструкции прошлого генофонда — через анализ его современной пространственной структуры — является самым распространенным, но не единственным.

Другой путь, используемый еще в «классическую» эпоху популяционной генетики, но ставший особенно популярным при исследованиях мтДНК и Y-хромосомы в последние два десятилетия, заключается в получении генетических датировок популяционных событий. Хотя и в этом случае начальной точкой являются данные о современном генофонде, но накопленное разнообразие пересчитывается в даты абсолютного времени [Рычков, 1986; Bandelt et al., 1995; Richards et al., 1996; 2000; Zhivotovsky et al., 2004 и другие работы]; в том числе в последние годы по данным полногеномного секвенирования Y-хромосомы [Roznik et al., 2013; Karmin et al., 2015; Balanovsky et al., 2015 и другие работы]. Полученные датировки дают более прямые оценки изменения генофонда во времени, чем при интерпретации географических (пространственных) закономерностей.

Третий путь к изучению изменчивости генофонда во времени является самым прямым. Он состоит в непосредственном генетическом анализе образцов ДНК от представителей давно ушедших поколений, благо такие образцы в виде костных останков в большом количестве предоставляет палеоантропология.

В данной книге, ориентированной на изучение изменчивости генофонда Европы не только в пространстве, но и во времени, использовались все три пути. Догадками о прошлом генофонда, сделанными на основании его современной пространственной структуры, пестрят главы 2, 3, 4, 5 и 6. Использование генетических датировок является основным содержанием главы 7, а ее теории уделено большое внимание в главе 1. А настоящая глава 8 посвящена третьему пути – анализу древней ДНК.

8.1. Особенности анализа древней ДНК

ИДЕЯ

Идея анализа древней ДНК (палеоДНК) проста: вместо того, чтобы на основании данных о современных популяциях догадываться, какими были генофонды их предков, изучать генофонды древности напрямую – проанализировав ДНК из костных останков (палеоантропологического материала). Таким образом, анализ палеоДНК, продолжая быть генетикой, является одновременно отраслью палеоантропологии, добавляя к используемым в палеоантропологии системам признаков (краниометрия, краниоскопия, одонтология, остеология) еще и «ДНКметрию». При этом подходы к статистическому анализу и осмыслению результатов при анализе древней ДНК те же, что и в классической палеоантропологии: изучаются те же самые находки, также они сравниваются друг с другом и с современным населением, также делаются выводы о миграциях или же преемственности населения.

ПЕРСПЕКТИВЫ

Анализ древней ДНК и сравнение полученных результатов с исследованиями современного генофонда является одной из наиболее перспективных областей среди современных наук о жизни. Это подтверждается большим числом публикаций в наиболее престижных научных журналах – Science, Nature и других [Pääbo et al., 1989; Handt et al., 1996; Cooper et al., 2000, 2001; Hofreiter et al., 2001; Naak et al., 2005, 2010, 2015; Noonan et al., 2006; Brotherton et al., 2007; Sampietro et al., 2007; Burbano et al., 2010; Lazaridis et al., 2014; Raghavan et al., 2014; Allentoft et al., 2015; Günthera et al., 2015]. В настоящее время исследования древней ДНК ведутся во многих лабораториях разных стран мира. Высокая научная значимость и

перспективность этих исследований общепризнана в научном сообществе, поскольку позволяет получать прямые данные о генофондах прошлых эпох и их динамике, которые иначе можно реконструировать только менее надежным косвенным путем из данных о современном народонаселении.

ПРОБЛЕМЫ

Это научное направление является технически сложным, и его развитие наталкивается на ряд объективных проблем.

Прежде всего, к ним относятся проблемы контаминации (загрязнения) древних образцов со стороны современной ДНК, малого количества и химической модификации ДНК, выделяемой из древних образцов.

Другой нередко возникающей проблемой является неполнота информации и о современном генофонде, сравнение с которым является одним из важнейших инструментов при интерпретации данных по древней ДНК.

Методы сравнения с современным генофондом и выявления структуры генофондов во многих случаях также оказываются недостаточно эффективны.

Наконец, существуют проблемы крайне малых объемов выборок по древней ДНК (как правило, только 5 – 10 образцов из популяции), и неравномерной представленности различных эпох и территорий в накапливаемых данных по изменчивости древней ДНК в популяциях человека.

Есть еще и методологическая проблема. Ведь когда мы изучаем современное население, то мы знаем, что у него имела цепочка предков на всем протяжении жизни человечества – и пытаемся ее проследить на тех или иных отрезках времени. Но когда мы изучаем древнюю ДНК, у нас нет уверенности, что это не «засохшая» ветвь истории, нет уверенности, что они оставили своих генетических потомков и что их гены дошли до современности или даже до следующей за ними эпохи.

КОНТАМИНАЦИЯ

Основной проблемой при изучении ДНК и основным источником ошибок является контаминация — случайное попадание современной ДНК в исследуемый древний образец. В результате разрушения ДНК в древних костях, количество ДНК столь мало, что для анализа используются методы максимальной чувствительности (вплоть до анализа единственной молекулы). Поэтому попадание в образец даже ничтожных количеств современной ДНК (неизбежно присутствующей во всех помещениях, где находятся люди) приведет к тому, что фактически будет изучена современная ДНК (например, ДНК с рук самого исследователя), но исследователь будет ошибочно считать, что полученная нуклеотидная последовательность характеризует древний образец.

Эта наиболее технически сложная проблема контаминации в настоящее время хотя и не может быть решена полностью, но минимизация рисков контаминирования и многократное сокращение ожидаемой частоты ошибок генотипирования реально достижимы в условиях специализированных центров анализа древней ДНК. Такие центры создаются с учетом всех потенциальных факторов контаминации и реализуют широкий спектр технических, методологических, методических, кадровых и организационных аспектов всех известных способов минимизации рисков контаминации. Такие центры к настоящему времени созданы в ряде стран мира.

ЛАБОРАТОРИИ ЗА РУБЕЖОМ

В области анализа древней ДНК успешно работает большое число зарубежных исследовательских коллективов. Среди них наиболее известными являются несколько коллективов:

1) коллектив под руководством проф. Сванте Паабо (Professor Svante Paabo, Institute for Evolutionary Anthropology, Лейпциг, Германия); именно этот коллектив выполнил нашумевшие работы по анализу мтДНК неандертальца, затем полного генома неандертальца и недавно генома человека из Денисовой пещеры на Алтае;

2) коллектив под руководством проф. Алана Купера (Professor Alan Cooper, Australian center for ancient DNA, Австралия), работавшего сначала в Оксфорде, а затем создавшего лабораторию в Австралии и известного как методическими работами, так и исследованиями древней ДНК популяций человека и различных видов животных;

3) новый организованный институт под руководством проф. Иоганнеса Краузе (Professor Johannes Krause, Institute for the Science of Human History, Йена, Германия), объединивший целый ряд ведущих специалистов в области археологии, лингвистики и древней ДНК, в том числе известных генетиков Вольфганга Хаака (Wolfgang Haak) из лаборатории Алана Купера и Гуиджо Брандта (Guigo Brandt) из лаборатории Курта Альта из Майнца (Германия);

4) коллектив под руководством проф. Эске Виллерслева (Professor Eske Willerslev, Centre of Excellence in GeoGenetics, Копенгаген, Дания), начавший с секвенирования полного генома эскимоса по единственному волосу (Rasmussen et al., 2010), а сейчас изучивший уже более сотни полных древних геномов.

Большое число других научных коллективов, работающих в этой области, можно разделить на две категории: коллективы, обладающие высокой научной репутацией (например, Дэвид Райх (David Reich, Harvard Medical School, США); Курт Альт (Professor Kurt Alt, University of Mainz, Германия); Карлос Лауренца-Фокс (Dr Carles Lalueza-Fox, Universitat Pompeu Fabra, Испания) и коллективы со спорной или неизвестной репутацией.

Вопрос о научной репутации для данной области исследований является принципиально важным потому, что технические особенности анализа древней ДНК легко могут привести к ложным результатам, и высокую профессиональную репутацию заслуживают только те исследователи и те лаборатории, которые тщательно минимизируют риски ошибок. Особенно важна репутация лабораторий древней ДНК и потому, что полученные результаты иногда нельзя даже попробовать воспроизвести, если уже израсходован весь пригодный для анализа ДНК материал из палеоантропологической находки. В этом случае остается лишь уповать на репутацию лаборатории и призывать коллег из смежных наук с большой осторожностью относиться к сенсационным выводам лабораторий «второй категории».

ЛАБОРАТОРИИ В РОССИИ

В России отсутствуют специализированные центры анализа древней ДНК, признанные на уровне мировой науки, хотя попытки такого анализа периодически предпринимаются отдельными лабораториями. Не рассматривая ряд провинциальных коллективов, осуществлявших такие попытки, но не достигших серьезных научных результатов (в частности, не имеющих значимых научных статей по этой теме), нужно отметить коллектив новосибирских исследователей, ведущих работы по древним популяциям Западной Сибири и Алтая [Молодин и др., 2000; Воевода и др., 2000; Pilipenko et al., 2015]. Хотя оснащение этой лаборатории, насколько можно судить, не вполне соответствует требованиям к полноценному центру анализа древней ДНК, а число научных статей невелико, этот коллектив является единственным (кроме нашего), активно ведущим в России популяционно-генетические исследования древней ДНК, и единственным, проводящим этап собственно анализа древней ДНК в России.

Также в ИОГен РАН коллективом под руководством проф. Е.И. Рогаева ведутся исследования деградированной и древней ДНК человека, результаты которых опубликованы в высокорейтинговых журналах [Rogaev et al., 2009 a,b; Григоренко и др., 2009]. В рамках этих исследований получены результаты, применимые для повышения эффективности анализа деградированных ДНК в криминалистике и судебно-медицинской экспертизе.

СХЕМА РАБОТЫ

Из изложенного становится понятным, почему в настоящее время эффективное изучение древней ДНК из антропологических серий с территории России возможно только в рамках сотрудничества с зарубежными центрами. Среди них Австралийский центр древней ДНК, возглавляемый проф. Аланом Купером, обладает высокой репутацией и является одним из лидеров данного направления исследований в мире. Поэтому результаты, приведенные в данной главе, были получены во многом в результате нашего многолетнего сотрудничества с Австралийским центром древней ДНК. За это время были проведены взаимные командирования сотрудников (д-р Вольфганг Хаак в Россию в 2008 году, О.П. Балановский в Австралию в 2010 году), ежегодные встречи и обсуждения на научных конференциях в разных странах (Китай в 2007 г, Эстония в 2008 г, США в 2009 и 2011 гг., Австралия в 2010 г). Это сотрудничество проходило в рамках международного проекта «Генографик» (2005-2012 гг.), в котором участвовали оба наших коллектива. По окончании проекта центр тяжести исследования древних популяций человека Австралийского центра древней ДНК переместился в новый мощный центр в Йене (Institute for the Science of Human History), объединивший целый ряд ведущих специалистов, в том числе и д-ра Вольфганга Хаака.

За это время была выработана наиболее эффективная схема сотрудничества, согласно которой зарубежная сторона проводит экспериментальный анализ (2 этап исследования) и статистическое моделирование (3 этап), российская сторона – сбор образцов (1 этап) и картографо-статистический анализ полученных экспериментальных данных (3 этап). Однако мне довелось поучаствовать и в экспериментальной работе (при исследовании генофонда скифов), что было необходимо для понимания особенностей технологии анализа древней ДНК и путей решения проблем, при таком анализе возникающих.

Кроме результатов нашей совместной работы с Австралийским центром древней ДНК, в этой главе описываются опубликованные при участии автора работы лабораторий Дэвида Райха (David Reich) и Эске Виллерслева (Eske Willerslev) а для полноты картины приводятся и литературные данные, взятые из публикаций других научных коллективов.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АНАЛИЗА ДРЕВНЕЙ ДНК

Этап экспериментального анализа палеодНК отличается как от палеоантропологии, так и от экспериментального анализа ДНК современных образцов. От палеоантропологии он отличается тем, что проводятся не измерения или описания формы или химического состава костей, а экстрагирование из костного материала ДНК и затем прямой анализ ДНК теми же методами и на таком же оборудовании, что и при анализе современной ДНК. А от анализа современного генофонда анализ древней ДНК отличается чрезвычайно жесткими требованиями к чистоте и стерильности эксперимента. Дело в том, что чувствительность методов ДНК анализа очень высока, и единичных молекул может быть достаточно для получения результата. В древнем образце, как правило, и сохраняются лишь единичные молекулы. Но такие же молекулы ДНК примерно в тех же концентрациях витают в воздухе любого помещения и находятся на любых предметах (в том числе ДНК костных останков из рядом лежащих коллекций, если та ДНК сохранилась лучше), которых касается сам исследователь или которых когда-либо касались другие люди, включая археологов, антропологов и работников музеев. И чрезвычайно велика опасность, что анализироваться будет не ДНК древнего образца, а посторонняя ДНК совсем другого человека, случайно попавшая в пробирку из какого-либо современного источника.

ПРОБЛЕМА КОНТАМИНАЦИИ

Именно поэтому в тех лабораториях, где занимаются анализом современной ДНК и где поэтому концентрация «витающей в воздухе» ДНК (в том числе амплифицированной) особенно велика, противопоказаны попытки анализа древней ДНК. Для анализа древней ДНК необходимо создавать специальные лаборатории, вся организация которых специально продумывается так, чтобы свести к минимуму риск контаминации древних образцов со стороны современной ДНК. Среди специалистов существует даже негласное ранжирование лабораторий древней ДНК по степени, в которой в них соблюдаются требования к чистоте эксперимента и, соответственно, по степени достоверности получаемых результатов.

В настоящее время разработано большое число правил для минимизации риска такой контаминации. К ним относятся:

- 1) технические требования (разделение лаборатории по зонам в соответствии с этапами анализа, боксирование этих зон, повышенное давление воздуха внутри лаборатории, выделение отдельных зданий, в которых никогда не проводились работы с современной ДНК, территориальная отдаленность этих зданий от лабораторий, изучающих современную ДНК и т.д.);
- 2) методические требования, состоящие главным образом в неукоснительном соблюдении повышенной чистоты и точности при постановке экспериментов (на практике это выглядит как «работа в скафандрах»);
- 3) технологические требования, связанные с особенностями ПЦР-анализа фрагментированной ДНК.

Соответственно, лаборатории, обладающие полным комплектом технического оснащения для минимизации контаминации и строго следующие правилам тщательной постановки экспериментов, со временем заслуживают высокую репутацию, что подтверждается как получаемыми ими результатами, так и проведением независимого дублирующего анализа в других центрах, получивших мировое признание.

Например, в Австралийском центре древней ДНК применяются различные рекомендуемые при работе с палеодНК подходы для минимизации риска контаминации: боксирование лабораторных помещений; защита образца от контаминации со стороны ДНК самого исследователя; удаление поверхностного слоя образца; работа в многослойной спецодежде — маски, перчатки, очки, комбинезоны (рис. 8.1.); непрерывное обеспечение стерильности помещений и рабочих мест; положительное давление воздуха для исключения воздушного потока извне; шлюзовые отсеки при входе в лабораторию и между основными рабочими зонами внутри лаборатории; тщательный выбор поставщиков реактивов и пластика (гарантия от случайной контаминации при фасовке и т.д.); специальное обучение персонала; исключение работы с современной ДНК в той же лаборатории; пространственная отдаленность здания лаборатории древней ДНК от любых зданий, в которых проводятся или проводились в прошлом работы с современной ДНК; многочисленные другие требования. Хотя каждый из этих методов по отдельности описан и рекомендован в специализированных научных работах, но комбинация всех этих методов, осуществляемая в Австралийском центре древней ДНК, имеет очень немного аналогов, обеспечивая максимально возможный уровень снижения рисков контаминации.

Дополнительным методическим приемом, применяемым нашим коллективом, является контрольное сравнение всех

получаемых нуклеотидных последовательностей древней ДНК со специально полученными последовательностями ДНК лиц, которые могли контаминировать древние образцы (археологов, палеоантропологов, сотрудников музеев, самих исследователей-генетиков).

При исследовании митохондриальной ДНК важным аспектом является разработанный австралийскими коллегами метод одновременного мультиплексного анализа панели SNP-маркеров, определяющих принадлежность образца к одной из основных гаплогрупп митохондриальной ДНК. Одновременное получение для древнего образца данных по всем основным SNP маркерам повышает достоверность результата за счет многократного взаимного контроля и позволяет провести анализ при использовании меньшего количества ДНК.

ПРОБЛЕМА НЕМНОГОЧИСЛЕННОСТИ

Другая проблема состоит в немногочисленности палеоантропологического материала, пригодного для анализа древней ДНК. Поэтому большинство исследований палеодНК основаны на выборках всего лишь в несколько образцов, тогда как для надежных сравнений генофондов нужны выборки в десятки и сотни проанализированных индивидуумов. Эта проблема решается двумя путями.

Во-первых, по мере того как направление анализа древней ДНК набирает силу, совершенствуют свои методы и создает новые лаборатории, постепенно увеличиваются как средние объемы выборок, так и число уже проведенных исследований. И, объединяя результаты сразу нескольких исследований древней ДНК, можно уже получить выборку разумного объема (хотя она и будет представлять не локальную популяцию, а в целом определенную эпоху на определенном континенте).

Во-вторых, широко используется метод сравнения (немногочисленных) данных по древней ДНК с (многочисленными) данными по современному населению. Также, поскольку данные по древней ДНК, очевидно, представляют большую научную ценность, то на их статистический анализ и осмысление затрачиваются и куда большие усилия, чем было бы целесообразно затратить на анализ выборки столь же небольшого объема из какой-либо современной популяции.

Таким образом, преимущества и ограничения анализа древней ДНК и анализа современных генофондов противоположны. При анализе современной ДНК доступны обильные данные о генофондах, но возникает проблема вычленения, какая из черт генофонда сформировалась в какую эпоху. А при анализе древней ДНК доступны прямые данные о генофонде прошедших эпох, но на первый план выходит проблема ограниченности исходных данных. Совместный же анализ как современной, так и древней ДНК позволяет отчасти взаимно компенсировать эти недостатки и приблизиться к более надежной реконструкции истории формирования генофондов и тех событий в истории популяций, которые явились причиной этих генетических процессов.

8.2. Средний палеолит (неандертальцы)

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ И ЯДЕРНЫЙ ГЕНОМЫ НЕАНДЕРТАЛЬЦА

Исследования древнейших геномов человека связаны, прежде всего, с именем шведского исследователя Сванте Паабо (*Svante Pääbo*). Эти исследования начались с секвенирования митохондриальной ДНК неандертальца в 1997 г. Она оказалась значительно отличающейся от всех вариантов мтДНК современного человека, то есть по мтДНК не было обнаружено никакого смешения между кроманьонцами и неандертальцами. Этот результат был подтвержден и дальнейшими исследованиями других лабораторий мира. Был сделан вывод, получивший самое широкое освещение в СМИ, что неандертальцы полностью тупиковая ветвь эволюции человека, поскольку в формировании генома современного человека нет вклада неандертальцев.

Но совершенствование генетических технологий позволило перейти уже от изучения митохондриального генома – ко всему геному неандертальца. Эта работа, начавшаяся в 2006 году, сначала также не позволяла выявить «неандертальские гены» в геноме современного человека. Но технологии анализа стремительно развивались, и в 2010 году был получен «черновой» геном неандертальца с покрытием около 1, то есть каждый участок генома был секвенирован в среднем только один раз. Это для технологий секвенирования следующего поколения (NGS) крайне недостаточно — при секвенировании современных геномов в последние годы считается «нормой» покрытие в 60-70, и уж в любом случае не менее 30. Однако плохая сохранность древней ДНК приводит к тому, что как мы увидим из дальнейшего изложения, покрытие при секвенировании древних геномов зачастую меньше даже единицы. Поэтому надо всегда оценивать вероятность биоинформационной ошибки, зависящей от степени «покрытия» — надежности прочтения генома.

В результате анализа этого «чернового» генома неандертальца выяснилось, что около 1-2% генома современного населения Евразии имеют неандертальское происхождение. Дальнейшие исследования показали, что эта доля варьирует от 1% до 3-4% по Евразии (в Азии чуть больше, чем в Европе), но очень невелика (по более ранним данным – даже полностью отсутствует) у современного населения Африки южнее Сахары. Это позволило сделать вывод, что небольшая метисация между неандертальцами и кроманьонцами (неоантропами) в Евразии все же была. Напомню, что ареал неандертальцев простирался от Западной Европы через Крым и Кавказ до Средней Азии и Алтая, включая в себя Переднюю Азию.

В июне 2015 года мне довелось слушать об этом в лекции Сванте Паабо, и в ответах на вопросы он рассказал следующий случай. В одном из наиболее известных музеев мира на экспозиции, посвященной неандертальцам, на основании первой статьи (по мтДНК) утверждалось, что они совсем не смешивались с человеком современного вида. Но после выхода следующей статьи сотрудники музея оперативно сменили табличку. Это хороший урок и самим генетикам, и тем представителям смежных наук, которые часто доверяют всему, что «показано по ДНК». Дело в том, что оба результата с точки зрения генетики верны, точны и подтверждены многочисленными исследованиями. Просто молекула митохондриальной ДНК короткая и не сохранила следов общих генов с неандертальцами, обнаруженных несколькими годами позже при исследовании всего остального генома – ядерной ДНК.

В СОВРЕМЕННЫХ ГЕНОМАХ ЕВРАЗИИ ЦИРКУЛИРУЮТ 20% НЕАНДЕРТАЛЬСКОГО ГЕНОМА

Итак, представление о том, что неандерталец нам не родственник, было опровергнуто после того, как в 2010 году Сванте Паабо секвенировал его ядерный геном. В отличие от мтДНК неандертальца, которая не обнаруживает сходства ни с одним из вариантов мтДНК современного человека, в ядерной ДНК обнаружили признаки метисации. Это привело исследователей к выводу, что *Homo sapiens* и *Homo neandertalensis* смешивались, и около 1-4% генома в современных популяциях Евразии имеют неандертальское происхождение.

Дальнейшие исследования и более глубокий анализ позволили вытащить на свет многие последовательности неандертальской ДНК, спрятанные в современных геномах. У разных людей неандертальское генетическое наследие неодинаково как по размеру, так и по набору фрагментов ДНК. Популяционные генетики из Вашингтонского университета [Vernot, Akey, 2014] подсчитали *суммарное* количество неандертальских последовательностей, сохранившихся в современных геномах. Для этого они проанализировали 665 геномов современных людей (379 жителей Европы и 286 – Восточной Азии), которые были секвенированы в рамках проекта «1000 геномов», выделили все участки интрогрессии (включения неандертальской ДНК) и сравнили их с эталонным геномом неандертальца, секвенированным коллективом Сванте Паабо. Проверенные таким образом «неандертальские» последовательности составили около 600 Mb (мегабайт, миллионов пар оснований), что составляет около 20% неандертальского генома. Иными словами, большая доля – пятая часть генома неандертальцев – хранится и циркулирует в геномах человечества. Эта величина никак не противоречит тому, что в геноме каждого человека (неафриканского происхождения) содержится не более 1-4% неандертальской ДНК. Ведь у разных людей эти фрагменты разные, и только в сумме они приводят к такой большой доле.

Неандертальские последовательности в геноме современных людей довольно короткие – не больше 57 Kb (килобаз, тысяч нуклеотидов). Это объясняется тем, что со времени гибридизации с неандертальцами прошло много времени, и длинные последовательности оказались разбиты рекомбинациями. В разных популяциях и у разных людей в ДНК прячутся разные неандертальские последовательности. В среднем на человека приходится по 23 Mb неандертальской ДНК.

В этом исследовании было также показано, что современные популяции Азии унаследовали в среднем на 21% неандертальских последовательностей больше, чем европейцы.

САПИЕНСЫ И НЕАНДЕРТАЛЬЦЫ – НЕДАВНИЙ ОБМЕН ГЕНАМИ

Одно из самых интересных открытий последнего года [Fu et al., 2015] показывает, что метисация сапиенсов и неандертальцев происходила не только после выхода сапиенсов из Африки, то есть 50-60 тысяч лет назад, но и гораздо позже. И не только на Ближнем Востоке, как до сих пор считали, а и в Европе. Этот результат получен в работе коллектива Сванте Паабо, в которой исследовали ДНК древнейшего современного человека на территории Европы, возрастом 37-42 тыс. лет (по радиоуглеродной датировке). Нижнюю челюсть Oase 1 в 2002 году обнаружили в Румынии, в подводной пещере Peștera cu Oase (название означает «пещера с костями»). Строение челюсти соответствовало анатомически современному человеку, хотя некоторые признаки указывали на его родство с неандертальцами. А вскоре после этого из пещеры был извлечен череп другого индивида (Oase 2), и этот череп подтвердил догадки о неандертальских предках. Оставалось проверить это генетически.

Из челюсти Oase 1 извлекли митохондриальную и ядерную ДНК. Анализ показал, что это мужчина, его Y-хромосомный гаплотип относился к макрогаплогруппе F, которая объединяет большинство гаплогрупп, распространенных сегодня на

территории Евразии. Ядерный геном Oase 1 по маркерам однонуклеотидного полиморфизма (SNP) проверили на сходство с большим количеством геномов современных людей. Оказалось, что Oase 1 имеет больше общих аллелей с восточноазиатскими популяциями и с американскими индейцами, чем с европейцами. Этим он отличается от другого почти столь же древнего европейца – со стоянки Костенки-14, возрастом 36-39 тыс. лет, который проявляет большее сходство с современными европейскими популяциями, чем с восточноазиатскими. Эта особенность привела авторов к заключению, что Oase 1 принадлежал к ранней европейской популяции анатомически современных людей, которая практически не внесла вклада в генофонд более поздних европейцев.

Чтобы оценить неандертальский вклад в геном Oase 1, было подсчитано число неандертальских аллелей во многих современных и нескольких древних геномах (взяв за исходный геном алтайских неандертальцев). Доля неандертальских последовательностей у Oase 1 оказалось существенно выше, чем у современных людей, и чем у древних людей анатомически современного вида. Подсчет показал, что Oase 1 несет 3746 аллелей неандертальского происхождения, образцы из Усть-Ишима (42-43 тыс. лет назад) и Костенок-14 (36-39 тыс. лет назад) – в два-три раза меньше (1586 и 1121 аллелей соответственно), образцы из Китая и Франции — 1322 и 1033. То есть, неандертальский вклад в Oase 1 оказался в несколько раз выше, чем в остальных геномах. Долю неандертальской ДНК в геноме Oase 1 определили тремя методами, которые дали несколько различающиеся результаты – от 6,0% до 9,4%, в среднем ее оценили в 7,3%. При этом неандертальские последовательности были распределены по хромосомам неравномерно: в семи участках их было особенно много, а когда исключили эти участки, доля неандертальской ДНК упала до 4,8%.

Важнее всего то, что фрагменты неандертальской ДНК в геноме Oase 1 достигали значительной длины, в некоторых участках генома они превышали 50 сМ (сантиморганид). Это означает, что данные фрагменты еще не успели разбиться рекомбинациями. Проанализировав длину фрагментов, определили, что метисация предков Oase 1 с неандертальцами произошла совсем недавно — это случилось всего за 4-6 поколений до его рождения.

Итак, смешение предков этого неантропа произошло примерно за пять поколений до времени жизни этого человека. То есть около 40 тыс. лет назад происходила метисация неантропов с неандертальцами в Европе. И поскольку сто лет – это немного, то и само событие метисации скорее всего случилось в том же регионе, где был обнаружен сам Oase 1, то есть на Балканах. Так что геном Oase 1 показал, что метисация неантропов с неандертальцами происходила не только непосредственно после выхода из Африки и не только на Ближнем Востоке, но случалась и позже, когда сапиенсы одновременно с неандертальцами жили в Европе.

Однако, поскольку Oase 1 генетически не похож на поздних европейцев, нельзя исключать, что он мог быть членом первоначальной ранней популяции сапиенсов, которая смешалась с неандертальцами, но не оставила заметного следа в последующем генофонде. Для более точных предположений нужно проанализировать другие останки из пещеры Oase и исследовать прочие популяции древнейших сапиенсов Европы.

ДЕНИСОВСКИЙ ЧЕЛОВЕК

Следующий виток исследований был связан с обнаружением в Денисовой пещере на Алтае в слоях большой древности фрагмента кости пальца – настолько маленького, что антропологическими методами было невозможно определить, к какому виду гоминид он относится. А когда был секвенирован геном, оказалось, что это третий вид (или подвид – классификации разные) человека разумного. Этот вид назвали «денисовцем» (от названия места находки — Денисовой пещеры, а название, в свою очередь, происходит от имени спасавшегося в ней монаха Дионисия). Происхождение названия «денисовец», таким образом, полностью аналогично происхождению названия «неандерталец», названным по месту первой находки – небольшому гроту около Неандертской пещеры. Денисовцы – единственный вид гоминид, выявленный не морфологическими, а генетическими методами.

На древе родства популяций гоминид денисовцы объединяются сначала с неандертальцами, а уже потом с анатомически современным человеком, но эти развилки столь близки, что три вида (или подвида *Homo sapiens*) — кроманьонцы, неандертальцы, денисовцы — можно рассматривать и как три равноправных таксона.

В последующих исследованиях было обнаружено, что вклад денисовцев особенно велик в население Меланезии (до 5%). Это удивительно, потому что – где Меланезия, и где Алтай с Денисовой пещерой! Поэтому большинство исследователей, включая и самого Сванте Паабо, предполагают, что ареал денисовцев включал не только Сибирь, но чуть ли не всю Азию – не только к северу, но и к югу от Гималаев. Поэтому возможно, что предки меланезийцев встретили денисовцев и смешались с ними в Юго-Восточной Азии — по пути предков меланезийцев из Африки в Меланезию.

НЕАНДЕРТАЛЬЦЫ ИЗ ДЕНИСОВОЙ

В геномах денисовцев и неандертальцев выявляются и смешения друг с другом, что неудивительно, поскольку в той же Денисовой пещере обнаружены останки и неандертальцев. Обнаружен в их геноме вклад и еще одной – неизвестной – популяции, которую можно гипотетически считать еще неизвестным, четвертым подвидом *Homo sapiens*. Таким образом, изучение древних геномов начинает прорисовывать сложную картину: в среднем палеолите Евразии были не разделенные друг от друга неандертальцы и кроманьонцы, а существовала метапопуляция гоминид, включающая несколько видов или подвидов.

Если первоначально данные по геному неандертальца ограничивались анализом единственного образца, то впоследствии коллективом Сванте Паабо было проанализировано большое их число, в том числе были проанализированы останки нескольких неандертальцев, найденных в Денисовой пещере. И, по крайней мере, у одного из них по длине не разбитых рекомбинацией кусочков генома стало понятно, что он потомок очень инбредного брака – людей, состоящих примерно во второй степени родства [Prüfer et al., 2014]. Нужно отметить, что сам Сванте Паабо не спешит приписывать практику близкородственных браков всем неандертальцам: он считает, что нужно секвенировать больше неандертальцев, чтобы понять, типичен ли для них высокий инбридинг или это исключение.

САМЫЙ ДРЕВНИЙ ГЕНОМ НЕАНДЕРТАЛЬЦА

Одно из последних громких открытий, связанных с неандертальцами, произошло при совместном исследовании антропологами и генетиками «альтамурского человека», найденного в 1993 году в карстовой пещере Ламалунга возле города Альтамурра в Италии [Lari et al, 2015].



Этот скелет был почти полностью погружен в отложения известняка, на поверхности оставалась лицевая часть черепа и некоторые кости. Из-за этого даже спустя много лет после находки исследование ограничивалось лишь описанием внешнего вида, доступного для обозрения. Судя по антропологическим признакам, скелет принадлежал человеку эпохи среднего — начала позднего плейстоцена. И хотя по некоторым чертам черепа он походил на неандертальца, по другим чертам отличался от большинства известных неандертальских скелетов. В 2009 году, фрагмент скелета (часть правой лопатки) удалось осторожно извлечь для антропологического и генетического ее исследования. Эта работа проведена итальянскими специалистами под руководством Джорджио Манци (Giorgio Manzi) из Римского университета при участии специалистов из Австралии и Испании.

Возраст скелета был определен методом урано-ториевой датировки известковых отложений на поверхности кости. На срезе были последовательно датированы слои этих отложений, от внешних к внутренним, что позволило датировать находку интервалом от 130 до 170 тыс. лет назад, то есть можно условно принять среднюю датировку около 150 тыс. лет. Антропологи провели детальное исследование фрагмента лопатки и по совокупности признаков поместили ее в неандертальский кластер. «Альтамурский человек» по имеющимся антропологическим признакам занял место между ранними и поздними неандертальцами.

Генетикам тоже удалось извлечь из останков ДНК, но она была очень фрагментирована, что неудивительно для останков такого возраста. Все же один фрагмент митохондриальной ДНК удалось секвенировать. Несколько позиций мтДНК несли типично неандертальские варианты (A16230G, G16244A, C16256A, A16258G) и отличались от гаплотипов как *Homo sapiens*,

так и денисовского человека. Прежде всего это означает, что образец при манипуляциях с ним не был загрязнен ДНК современного человека.

По полученному фрагменту мтДНК было проведено сравнение всех известных митохондриальных геномов неандертальца и денисовского человека и построено филогенетическое дерево (рис. 8.2). Как можно видеть на построенном дереве, «Альтамурский человек» вошел в один кластер с другими неандертальскими образцами из Западной Европы. Таким образом, это самый древний неандерталец, из останков которого была извлечена ДНК, и полученные результаты указывают на то, что популяция неандертальцев около 150 тыс. лет назад была неоднородна.

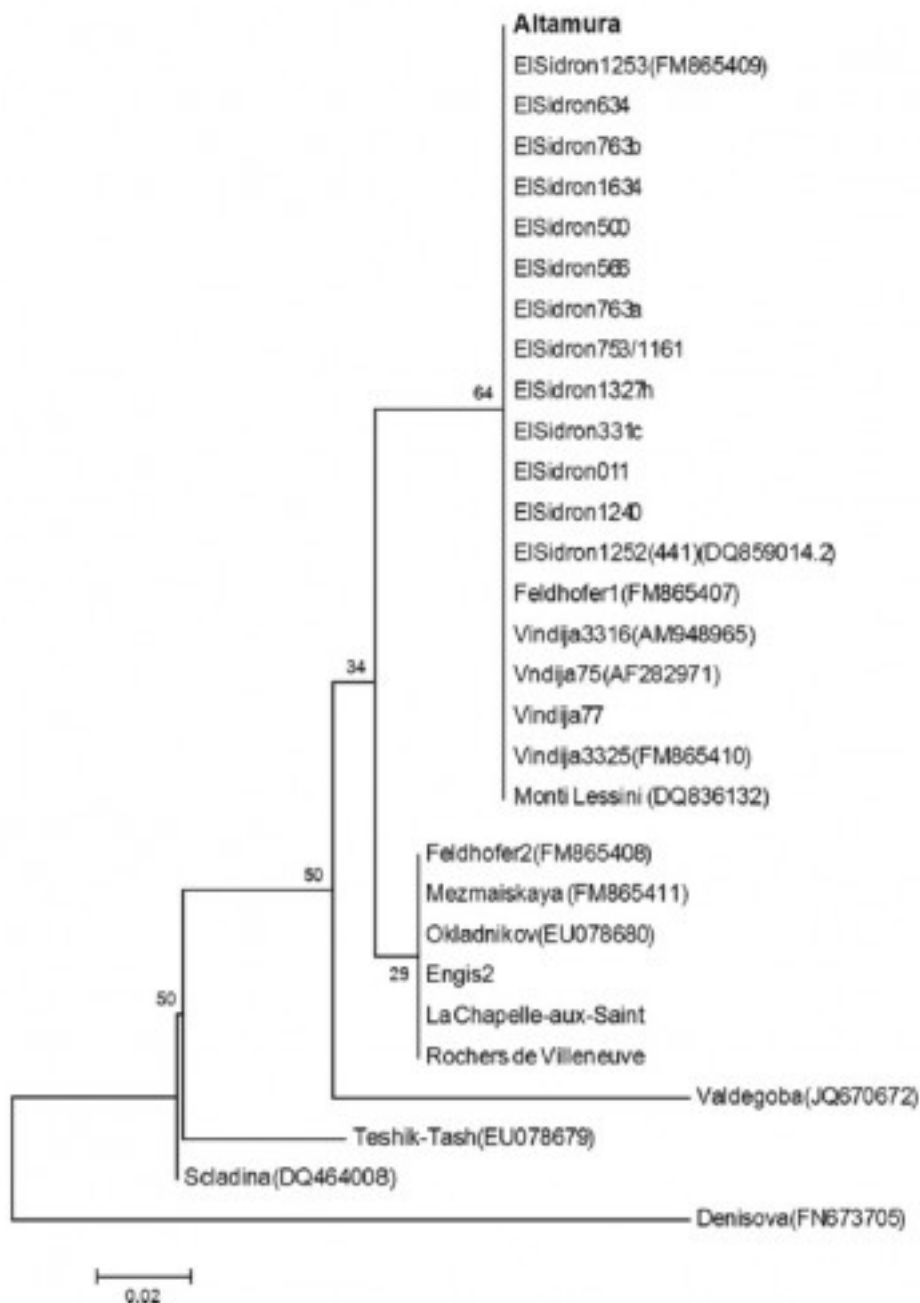


Рис. 8.2. Филогенетическое дерево изученных образцов неандертальцев, включая «Альтамурского человека» [Lari et al, 2015]. Дерево построено по данным о мтДНК. Геном «денисовца» использован в качестве внешней группы.

ЭФФЕКТЫ ОТБОРА: ОТ НЕАНДЕРТАЛЬЦА К НЕОАНТРОПУ

Данные по геному неандертальца, включенному в генофонд современного человечества, позволяют провести и функциональный анализ этих фрагментов генома. По этому поводу возникает еще больше эмоций и вопросов, чем по поводу

родства неандертальцев и людей современного вида.

Даже если только один процент нашего генома унаследован от неандертальцев – этого достаточно, чтобы проводить статистический анализ. Рассматривая разные участки генома вдоль хромосомы, естественно предполагать, что в любом сегменте чисто случайно будет примерно одинаковое количество неандертальских последовательностей. Но геном неантропа (то есть наш геном) оказался очень неоднородным по содержанию неандертальской ДНК: например, 8-я и 17-я хромосомы совсем не содержат неандертальской ДНК, а есть участки и отдельные гены, в которых ее намного больше среднего. Поэтому если мы где-то видим достоверный «всплеск» — повышение доли неандертальских последовательностей, то можно предполагать действие естественного отбора, который подхватил неандертальские по происхождению аллели, если они были адаптивны и полезны для неантропа. Оказалось [Vernot, Akey, 2014], что примерно 26% от всех кодирующих белки генов имеют кроме чисто сапиентных аллелей еще и такие аллели, в которых один или больше экзонов (участков, несущих информацию о белках) несут неандертальские последовательности. К генам с повышенным неандертальским вкладом относятся гены, которые экспрессируются в кератиноцитах – клетках кожи, и регулируют ее пигментацию. Возможно, здесь приобретение неандертальских аллелей повысило способность сапиенсов адаптироваться к разным климатическим условиям при расселении по планете. А аллель адаптации к жизни на большой высоте у тибетцев считается заимствованным от денисовцев.

Кроме всплесков, есть и «впадины» – участки хромосомы, в которых последовательности или не передавались от неандертальцев или передавались, но потом отсекались отбором. Например, такие участки типичны вблизи генов, участвующих в сперматогенезе. К участкам генома, обедненным неандертальскими последовательностями, относят и участок на седьмой хромосоме, содержащий ген *FOXP2*, фактор транскрипции, игравший, как считает ряд исследователей, важную роль в появлении человеческой речи.

Некоторые из таких участков, обогащенных неандертальской ДНК, являются общими для современных популяций Азии и Европы, другие встречаются только в одной из частей Евразии. Поэтому можно рассмотреть две модели гибридизации (рис. 8.3). В соответствии с первой, поток неандертальских генов был принят популяцией – общим предком населения и Западной и Восточной Евразии. Вторая модель предполагает, что помимо этого, основного потока, случилось еще одно, меньшее вливание неандертальских генов в популяции Азии уже после их отделения от общего предка с европейцами. В пользу второй модели говорит большая доля неандертальского генома, циркулирующая в азиатских популяциях.

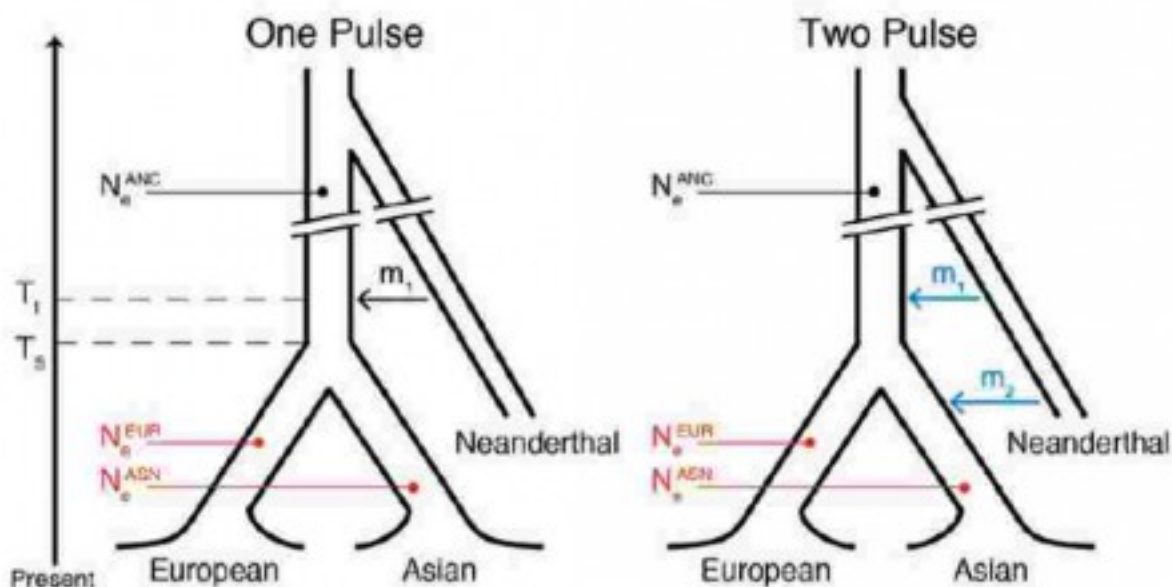


Рис. 8.3. Две модели интрогрессии неандертальской ДНК в геном европейских и азиатских популяций: один поток генов к предковой популяции или дополнительный поток генов в Азии [Vernot, Akey, 2014].

ЭФФЕКТЫ ОТБОРА: ОТ ОБЩЕГО ПРЕДКА К НЕОАНТРОПУ.

Еще один вариант анализа – это поиск генетических вариантов, специфичных только для человека современного вида. То есть тех вариантов, которые есть у всех современных людей, но их нет не только у шимпанзе, но и у неандертальцев. Получается, что эти генетические варианты возникли на самых последних этапах эволюции, ведущей к человеку современного вида.

Найдено всего лишь 30 тысяч таких SNP, из них меньше сотни приводят к аминокислотным заменам. К настоящему времени подробно проанализированы и осмыслены не все из них, поскольку в первую очередь исследователи концентрировались на анализе тех из этой сотни генов, которые связаны с работой мозга.