

## Древние белки рассказывают истории

Когда ДНК деградирует, белки могут сохраняться. Поэтому ученые исследуют самую раннюю человеческую историю, используя очень древние аминокислоты.

**Публикуем перевод научно-популярной статьи в журнале Nature, посвященной относительно новому направлению в молекулярной археологии – исследованию древних белков, или палеопроотеомике.**

*Мэттью Уоррен*

В далеком прошлом, 160 тысяч лет назад один древний человек окончил свою жизнь в пещере на Тибетском нагорье в Китае. Возможно, он сам пришел сюда умирать, возможно, его тело принесли сюда родственники или затащили хищные звери. Через несколько лет его ткани разложились, и кости стали смещаться. Прошли тысячелетия. Ледники наступали и отступали, и все, что осталось от скелета человека, это часть челюстной кости с несколькими зубами. Кости постепенно покрывались минеральной коркой, и ДНК деградировала под действием времени и окружающей среды. Но некий сигнал из прошлого в костях дошел до наших дней.

В глубине ткани зуба сохранились белки, которые тоже деградировали, но их еще можно было определить. Когда ученые их анализировали, они обнаружили коллаген, структурный белок костной и других тканей. В его составе была найдена аминокислота, которая не содержится в коллагене современного человека или неандертальца – это означало, что челюстная кость принадлежит представителю самой загадочной группы древних людей под названием денисовцы<sup>1</sup>. Находка останков денисовца в Китае стало громким открытием. Это первые останки денисовца, найденные не в Денисовой пещере на Алтае; все останки, изученные до сих пор, были именно оттуда. Более того, само место обнаружения челюсти – Тибетское плато, на высоте более 3000 метров над уровнем моря – говорит о том, что денисовцы были способны жить в суровых условиях высокогорья, с малым содержанием кислорода в воздухе.

Но это открытие стало и другой важной вехой – впервые вид древнего человека был определен исключительно по белку.

Это наиболее яркий результат в области палеопроотеомики, в которой ученые исследуют древние белки для ответов на вопросы об истории и эволюции человека и других видов. Белки, сохраняющиеся в ископаемых останках много дольше, чем ДНК, помогают ученым исследовать все более древние эры преистории и использовать молекулярные инструменты для анализа костей с гораздо более обширной территории планеты.

Ранее ученые исследовали белки из зубов животных возрастом 1,8 млн лет и из скорлупы яиц возрастом 3,8 млн лет. Теперь они надеются, что палеопроотеомика сможет сказать новое слово в исследовании других видов древнего человека, из которых невозможно извлечь ДНК, — от *Homo erectus*, широко расселившегося по миру от 1,9 млн до 140 тыс. лет назад, до *Homo floresiensis*, миниатюрных людей, живших 60 тыс. лет назад в Индонезии, которых окрестили «хоббитами». Исследуя вариации этих белков, ученые надеются найти ответы на издавна стоящие вопросы об эволюции групп древних людей; в том числе вопрос о непосредственном предке современного человека.

«Я думаю, что мы можем кардинально изменить все древо человечества», — считает Мэттью Коллинз, биоархеолог из Университета Копенгагена, бывший на переднем крае этой области науки, начиная с 1980-х гг.

### Новые возможности и новые трудности

Несмотря на общее воодушевление, некоторые ученые считают, что картина истории, полученная по белкам, лишь

ограниченно сопоставима с картиной, полученной по ДНК. Некоторые обеспокоены тем, что палеопротеомика будет получать ложные результаты, которые возникают из-за контаминации образцов. «Мы видим очень хорошие исследования, но наряду с эти мы видим публикации очень странных результатов, которые появляются из-за того, что авторы некритично подходят к методам», — говорит Филипп Штокхаммер, археолог из Университета Людвиг Максимилиана в Мюнхене, Германия.

На протяжении прошлых двух десятилетий ДНК, извлеченная из древних человеческих останков, существенно трансформировала понимание эволюции человека. Анализ сходств и различий в ДНК в различных группах гоминин позволил исследователям построить сложное эволюционное дерево, которое невозможно было построить ранее. Генетический материал привел к фундаментальным открытиям, и прежде всего, к открытию денисовского человека.

Но в этой картине бросается в глаза очевидная брешь. ДНК была секвенирована только у трех групп гоминин: неандертальцы, денисовцы и *Homo sapiens*, и по большей части в образцах возрастом менее 100 тысяч лет (единственное исключение – неандерталец возрастом 430 тысяч лет из Испании<sup>2</sup>). Несколько сотен тысяч лет в глубь времени – и мы вступаем в темные времена. Это период, когда случалось множество захватывающе интересных событий, сказал Фридо Уэкер, молекулярный антрополог из Университета Копенгагена. Например, когда ветви денисовцев и неандертальцев отделились от ветви, которая привела к современному человеку. Ученые не знают, были ли *Homo heidelbergensis*, жившие 700–200 тыс. лет назад, предками одновременно *H. sapiens* и неандертальцев или же только неандертальцев. *H. erectus* впервые вышли из Африки 1,9 млн лет назад, но без генетических доказательств остается неясным, как они связаны с поздними гомининами, в том числе с *H. sapiens*.

Древняя ДНК также оставляет большие географические «белые пятна». ДНК быстрее деградирует в жарком климате, так что почти 100-тысячелетние кости из холодной Сибири могут хранить больше генетического материала, чем гораздо более молодые кости из Африки или Юго-Восточной Азии. Как результат, у нас очень мало данных об относительно недавних гомининах из этих регионов, таких как *Homo floresiensis*.

Сегодня ученые надеются, что анализ белков может начать заполнять эту брешь в наших знаниях. Впрочем, идея не нова. Еще в 1950-х годах исследователи сообщали о нахождении аминокислот в ископаемых останках. Но долгое время технологии, способной секвенировать древние белки, не существовало. Положение изменилось в 2000-х, после того как ученые осознали, что метод масс-спектрометрии, используемый для анализа современных белков, можно применять и к древним белкам. Масс-спектрометрия включает разбивание молекулы белка на короткие цепочки аминокислот и измерение их массы, на основании чего вычисляется их аминокислотный состав.

Исследователи использовали этот метод для определения видовой принадлежности ископаемых костей животных – это зоомасс-спектрометрия (ZooMS), с помощью которой специалисты анализируют видовую принадлежность белка коллагена. Масса компонентов коллагена различается у разных видов, поэтому этот белок хранит «отпечаток пальца» данного вида в ископаемых костях.

ZooMS была использована в 2016 году<sup>3</sup> и для нахождения одной человеческой кости из тысяч фрагментов костей из Денисовой пещеры. Последующий анализ ДНК показал, что эта кость принадлежит метисному индивиду – потомку от денисовского отца и неандертальской матери (ее назвали Денни). Теперь Катерина Дука, археолог из Института наук об истории человека Общества Макса Планка в Йене использует этот же подход для поиска костей гоминин среди 40 тысяч неидентифицируемых обломков костей из Азии.

Но ZooMS рисует картину только «широкими мазками» — принадлежность кости к гомининам. Для углубленного анализа нужны другие технологии. Такие как shotgun proteomics (протеомика методом «дробовика»), которая способна идентифицировать все молекулы белка в образце – прочитать его протеом. Состав протеома зависит от вида ткани, но часто включает различные формы коллагена. Этот метод обнаруживает тысячи сигналов, что делает его более информативным, чем ZooMS, говорит Катерина Дука, но его результаты сложнее интерпретировать. Сравнивая эти сигналы с известными последовательностями в базе данных, исследователи могут идентифицировать точную последовательность коллагена или других белков в образце.

Затем ученые могут сравнить эти определенные белковые последовательности с таковыми в других группах гоминин и проанализировать сходства и различия в индивидуальных аминокислотах, что поможет поместить данный вид на эволюционное дерево. Аналогично тому, как палеогенетики интерпретируют различия в последовательности нуклеотидов в древней ДНК.

## Заполнение бреши

Хотя сначала исследователи использовали анализ белков в дополнение к анализу ДНК<sup>4</sup>, тибетский денисовец стал первым древним человеком, который был определен именно по белковой информации. На очереди другие задачи. Исследование белковых последовательностей гейдельбергского человека, например, позволит уточнить его эволюционные отношения с

сапиенсами и неандертальцами.

Другой интересный вопрос – предмет дебатов полутора десятилетий – это природа карликовых людей с острова Флорес, останки которых были найдены в 2003 году. Их родственные отношения с другими гомининами остаются неясными. Есть предположение, что они могут происходить от *H. erectus*, а возможно даже это отдельно эволюционирующая ветвь, идущая от австралопитеков.

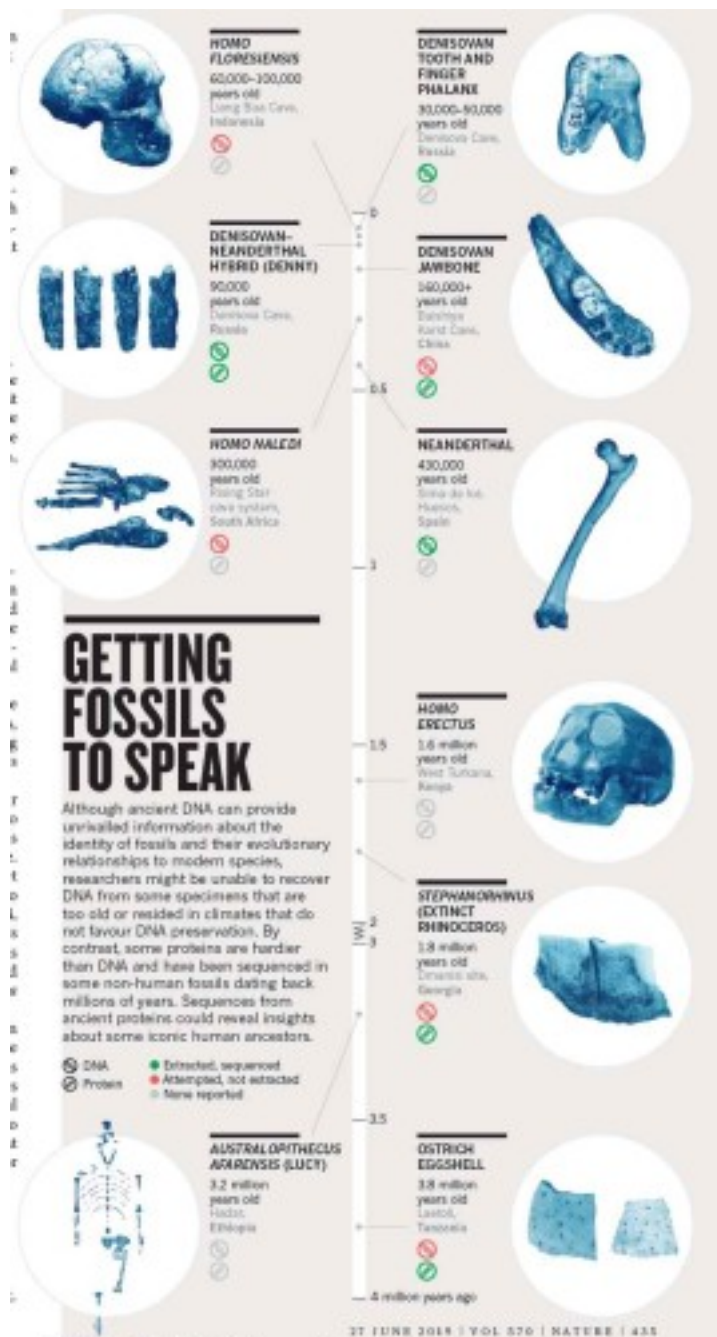
«Я убежден, что мы можем прочитать последовательности белков *Homo floresiensis*, и результат подскажет нам, где они должны располагаться на эволюционном дереве», — говорит Коллинз. То же должно быть верно и для других гоминин *Homo luzonensis*. Их кости и зубы были найдены в пещере на острове Лузон на Филиппинах несколько лет назад и данные по ним опубликованы в начале этого года <sup>5</sup>. Так же, как и *Homo floresiensis*, эти образцы не содержат ДНК, пригодной для анализа. Филиппинские археологи собираются послать Уэлкеру зуб *Homo luzonensis* для проведения анализа белков.

Пока ученые собираются активнее использовать белковый анализ для определения древних гоминин, работа с ископаемыми останками других животных уже дала много информации относительно их эволюции. Так, в недавней работе Уэлкер и его коллеги использовали протеомику для определения положения на эволюционном дереве вымершего носорога *Stephanorhinus*. В статье, опубликованной в препринте <sup>6</sup>, сообщается, что его команда извлекла белки носорога, найденного в Дманиси, Грузия, возрастом около 1,8 млн лет назад. Паттерн аминокислотных замен говорит о том, что вымерший носорог был близким родственником шерстистого носорога (*Coelodonta antiquitatis*).

В то время как белки тибетского денисовца были извлечены из дентина, ткани внутри зуба, белки древнего носорога были извлечены из эмали зуба. Эмаль – наиболее твердый материал в теле позвоночных животных, который предохраняет аминокислоты от вымывания. По мнению специалистов, возраст 1,8 млн – не предел для белкового анализа.

Но другие пошли еще дальше в прошлое. Исследователи сообщают об извлечении коллагена и определении его последовательности из останков верблюда, найденного в Арктике, возрастом 3,4 млн лет <sup>7</sup>. А в 2016 году биомолекулярные археологи из Туринского университета, Италия, извлекли и секвенировали коллаген из скорлупы яиц страуса возрастом 3,8 млн лет <sup>8</sup>. Причем эта скорлупа была найдена в Танзании, в жарком климате, который неблагоприятен для сохранения биологических молекул. Почему бы не попробовать изучить белки гоминин, найденных в таких же условиях?

## **Зубная боль**



Древние образцы разных видов, из которых были извлечены и секвенированы ДНК и/или белки. ДНК и белки обозначены разными символами в кружочке. Зеленый цвет – выделены, секвенированы; красный цвет – сделана попытка, но не выделены; серый цвет – нет информации.

Тем не менее, анализ белков древнего человека для уточнения его эволюционного дерева – это «скачки с препятствиями». Исследователи могут расшифровать последовательности белков древних гоминин, поскольку у них уже имеется ДНК неандертальцев, денисовцев и *H. sapiens*. Это позволяет предсказывать белковые последовательности, которые, вероятно, соответствуют сигналам масс-спектрометрии. «Вы можете идентифицировать фрагменты, которые вы ожидаете, исходя из известных геномных последовательностей древних и современных людей», — говорит Сванте Паабо, палеогенетик из Института эволюционной антропологии Общества Макса Планка, Германия. Но с продвижением в глубь времен ученые должны будут исследовать белковые последовательности, не опираясь на генетическую информацию, без «генетической карты». Это вызов для палеопротеомики, поскольку белки также деградируют, разрушаясь до маленьких фрагментов, и также подвержены контаминации.

Коллинз уверен, что это можно преодолеть. Он упоминает статью 2015 года<sup>9</sup>, в которой он, Уэкер и их коллеги картировали филогенетическое дерево южноамериканских копытных, которые вымерли 12 тыс. лет назад. У них не было ДНК этих животных, тем не менее, команда ученых секвенировала последовательность их коллагена и сравнила данные с другими видами. Они нашли, что два вымерших копытных *Toxodon* и *Macrauchenia* были в близком родстве с группой, включающей лошадей и носорогов, но не с другой группой – как считали некоторые зоологи – включающей слонов и ламантинов.

Другие ограничения носят более фундаментальный характер. Древние кости и зубы содержат мало белка, поэтому информации добывается не слишком много. Например, анализ тибетского денисовца выявил последовательности восьми различных видов коллагена, суммарно насчитывающих чуть больше чем 2000 аминокислот. Только одна из этих аминокислот отличалась от аминокислоты коллагена неандертальцев и сапиенсов, и это позволило идентифицировать образец как денисовский. Это означает, что даже если исследователи смогут секвенировать белок из *H. erectus*, у них может просто быть недостаточно информации для того, чтобы сделать вывод о его родственных отношениях с неандертальцами и сапиенсами. Для сравнения, один древний геном содержит порядка трех миллионов вариантов, которые можно сравнить с другими геномами, сказал Понтус Скогланд, палеогенетик.

И поскольку белки часто выполняют очень важную функцию, например, формируя структуру костей, они не всегда сильно отличаются между разными видами. Например, белки, характерные для зубной эмали, почти одинаковы у современных людей, неандертальцев и денисовцев. Хотя, по словам Уэлкера, эти белки отличаются у человека и антропоидов (человекообразных обезьян), так что, возможно, они и будут информативны при исследовании других групп древних гоминин.

Ученые пока еще мало знают о том, как аминокислотные последовательности отличаются в популяциях древних людей. При анализе белков тибетского денисовца они сравнивали его с денисовцем из Денисовой пещеры. Но возможно, что у других денисовцев будут другие варианты аминокислотных последовательностей коллагена. «Многие генетики скептически относятся к методологии белкового анализа, — говорит Дука, — но я думаю, это потому, что они ориентируются на долгий путь понимания геномных вариаций в древних популяциях».

Есть и другие трудности. Некоторые исследователи обеспокоены, что шум вокруг палеопротеомики может привести к тому, что эта область попадет в те же ловушки, что и палеогеномика 20 лет назад. Тогда появились интригующие результаты о ДНК из динозавров и из насекомых, замурованных в янтаре – позднее это все было признано фальшрезультатами, которые возникли из-за контаминации в процессе выделения ДНК. «Не исключено, что и в мире древних белков мы столкнемся с чем-то подобным», — предупреждает Дука.

Лидеры палеопротеомики сознают эти проблемы и прилагают все усилия, чтобы создать надежную методическую основу. Среди них Джессика Хенди, археолог из Университета Йорка, Великобритания, пионер в использовании анализа белков для изучения диеты древних людей. В статье 2018 года Хенди и ее коллеги выделили белки, содержащиеся на керамической посуде возрастом 8000 лет из древнего поселения Чатал-Хююк на территории Турции и показали, что его жители употребляли в пищу различные растения и мясо животных, а также перерабатывали молоко<sup>10</sup>.

«Эта технология так интересна и перспективна, что начинает привлекать пристальное внимание, — говорит Хенди. – Но мы должны двигаться вперед, не забывая об осторожности». Вместе с Уэлкером Хенди ведущий автор статьи, в которой рассматриваются разные методики палеопротеомики с целью избежать проблемы контаминации<sup>11</sup>.

Хенди добавила, что необходимы фундаментальные исследования, показывающие, как белки сохраняются и деградируют со временем. Эти исследования, вероятно, не станут предметом газетных заголовков, но они дадут больше информации для того, чтобы получать надежные результаты. Она привела в пример работу Демарчи, которая прочитала последовательность белка из яиц страуса возрастом 3,8 млн лет. Она обнаружила, что белки были связаны с минеральными кристаллами на поверхности скорлупы яйца. «Это круто, потому что объясняет то, почему белки так долго выживают, — говорит Хенди, — и это делает открытие намного надежнее».

Несмотря на все препятствия, прогресс в этой области не замедляется. И хотя эволюция человека привлекает наибольшее внимание, ученые используют анализ древних белков для самых разных целей – от изучения маркеров заболевания в зубном камне<sup>12</sup> до изучения того, как шкуры животных использовались для создания средневековых пергаментов<sup>13</sup>.

*перевод Надежды Маркиной*

1. Chen, F. *et al. Nature* **569**, 409–412 (2019).

2. Meyer, M. *et al. Nature* **531**, 504–507 (2016).

3. Brown, S. *et al. Sci. Rep.* **6**, 23559 (2016).

4. Welker, F. *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA* **113**, 11162–11167 (2016).

5. Déroit, F. *et al. Nature* **568**, 181–186 (2019).

6. Cappellini, E. *et al. Preprint at bioRxiv* <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/407692v1> (2018).

7. Rybczynski, N. *et al. Nature Commun.* **4**, 1550(2013).

8. Demarchi, B. *et al. eLife* **5**, e17092 (2016).
9. Welker, F. *et al. Nature* **522**, 81–84 (2015).
10. Hendy, J. *et al. Nature Commun.* **9**, 4064 (2018).
11. Hendy, J. *et al. Nature Ecol. Evol.* **2**, 791–799 (2018).
12. Jersie-Christensen, R. R. *et al. Nature Commun.* **9**, 4744 (2018).
  
13. Fiddyment, S. *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, 15066–15071 (2015).

**Источник:**

ANCIENT PROTEINS TELL THEIR TALES

BY MATTHEW WARREN

27 JUNE 2019 | VOL 570 | NATURE | 433