

Древняя ДНК: от неандертальца до колбасы

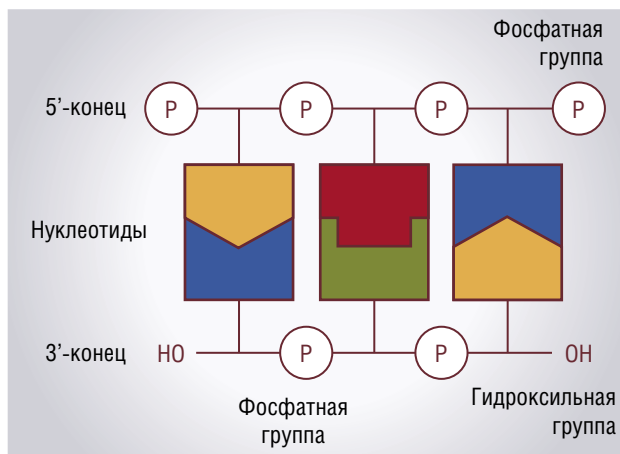
В 2012 г. эксперты журнала «Science» отметили работу молодого немецкого ученого Матиаса Мейера, который усовершенствовал способ подготовки для анализа ископаемой ДНК

Еще совсем недавно никто серьезно и не предполагал, что мы узнаем о животных и растениях, исчезнувших с лица нашей планеты, больше того, что могут сообщить ископаемые останки. Конечно, палеонтология дает много сведений о строении тела и даже образе жизни вымерших существ, но самые мощные, молекулярно-генетические методы исследования эволюционного родства, биохимии и физиологии в этом случае казались неприменимыми.

Анализ древней ДНК – область биологии, возникшая буквально на наших глазах за последние два десятка лет, для многих увлеченных наукой людей похожа на чудесное осуществление волшебной мечты. Но хотя в живой природе ДНК и используется в качестве основного носителя генетической информации, ее химическая стабильность ограничена: она может повреждаться в результате окисления, гидролиза, спонтанной утери нуклеотидных оснований и т.п. При жизни организма повреждению ДНК противостоят особые системы ее репарации («ремонта»), однако после его смерти в ДНК накапливаются необратимые изменения. В 1993 г. английский биохимик Т. Линдал опубликовал одну из самых часто цитируемых биологических статей, в которой показал, что ДНК не может сохраняться даже в самых благоприятных условиях (в отсутствие кислорода и в вечной мерзлоте) дольше миллиона лет. Если же мертвые ткани подвергаются действию высокой температуры или агрессивной химической среды, этот срок будет намного короче.

Однако, технологии анализа исчезающе малых количеств ДНК, основанные на использовании ПЦР (полимеразной цепной реакции) и массовом параллельном секвенировании, тоже не стояли на месте. С помощью

Ключевые слова: древняя ДНК, неандерталец, денисовец
Key words: ancient DNA, Neanderthaler, Denisovan



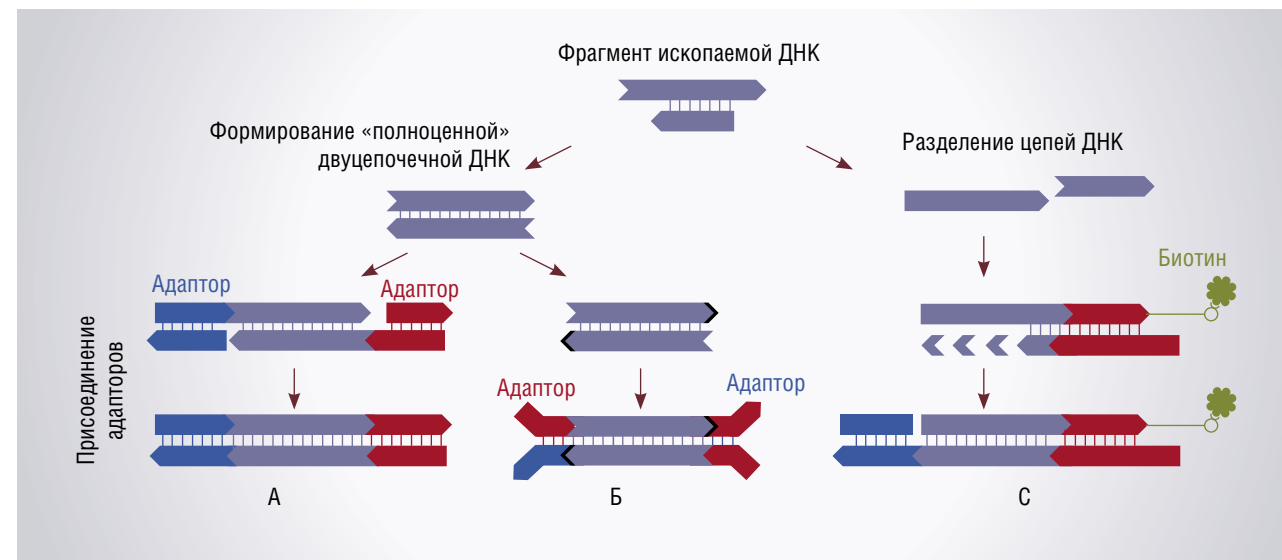
ДНК обычно состоит из двух цепей, каждая из которых составлена из отдельных звеньев – нуклеотидов, соединенных фосфатной группой. Существует четыре вида нуклеотидов; нуклеотиды разных цепей связываются между собой по принципу комплементарности (как ключ и замок). Концы линейной цепочки ДНК химически разные, один называется 5'-концом, а другой – 3'-концом. Как русский текст принято читать слева направо, так и последовательность ДНК принято «читать» от 5'-конца к 3'-концу

МЕТОД МЕЙЕРА

До недавних пор для приготовления образцов ДНК из ископаемого материала применяли два метода, основанные на «вытягивании» из древних останков фрагментов двуцепочечной ДНК. И поскольку ДНК в таких образцах сильно разрушена, ее фрагменты обычно представляют собой обломки, у которых на концах могут находиться выступающие группы одноцепочечных нуклеотидов. Но такие куски пока не умеют секвенировать, т.е. определять их нуклеотидную последовательность.

Поэтому оба традиционных метода начинаются с обработки обломка ДНК ферментом ДНК-полимеразой, который, с одной стороны, «достраивает» из кирпичиков-нуклеотидов недостающую ДНК на выступающих 5'-концах, используя их как матрицу, а также «съедает» выступающие 3'-концы. Фермент прекращает работу, когда все нуклеотиды окажутся «спаренными» (такие концы ДНК на жаргоне молекулярных биологов называют *тупыми*).

Далее два традиционных метода немного расходятся, но суть их обоих состоит в том, что к двуцепочечному фрагменту древней ДНК с двух концов присоединяются *адапторы* – небольшие синтетические двуцепочечные ДНК с известной структурой. После всех манипуляций получа-



Существует два традиционных метода приготовления секвенирования образцов («библиотек») ДНК из ископаемого материала. Первый был разработан компанией «454 Life Sciences» (А), второй – компанией «Illumina» (Б). М. Мейер из Института эволюционной антропологии общества Макса Планка (Лейпциг, Германия) предложил новый, более эффективный метод (С), который и был применен к ископаемой ДНК человека из Денисовой пещеры.
По: (Meyer et al., 2012)

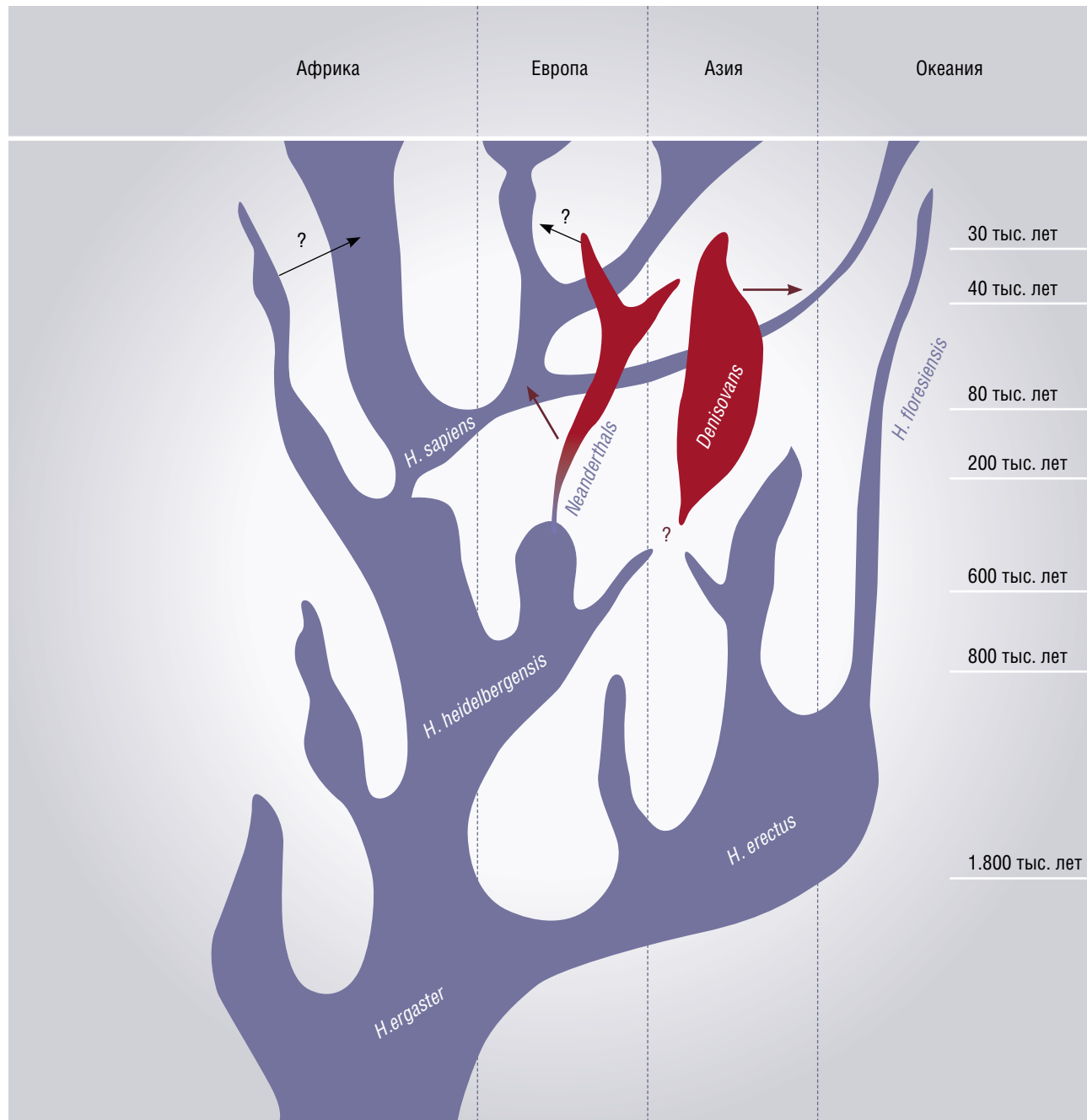
ется двуцепочечная ДНК неизвестной последовательности, окруженная адапторами – множество таких фрагментов называют *библиотекой ДНК*, которую и используют для секвенирования.

Основная проблема, связанная с использованием двуцепочечных фрагментов для построения библиотек древней ДНК, связана с тем, что исходная ДНК зачастую разрушена очень сильно. И если в одной цепи ДНК по соседству имеется несколько разрывов, то она просто развалится на куски и в библиотеку не попадет. То же самое будет и в том случае, если в ДНК есть повреждения, препятствующие работе ДНК-полимеразы. Из-за всего этого точность прочтения древней ДНК оказывается невысока. При секвенировании современных образцов для исключения случайных ошибок каждая позиция в геноме независимо прочитывается с разных копий ДНК несколько десятков раз (так называемое покрытие генома). А вот опубликованный геном денисовца имеет покрытие всего 1,9, а геном неандертальца – 1,3, что означает большую вероятность ошибки в любом месте последовательности.

Согласно методу, разработанному М. Мейером, у исследуемой ДНК удаляют фосфатную группу с 5'-конца, а затем

ДНК нагревают, чтобы цепи разделились. К 3'-концу такой одноцепочечной ДНК присоединяют одноцепочечный адаптор, молекулу вещества биотина. Биотин, более известный как витамин Н или витамин В7, играет здесь роль своеобразного якоря: он способен очень тесно связываться с бактериальным белком стрептавидином, что дает возможность осадить такую ДНК на микроскопические шарики, покрытые этим белком. После этого добавляется цепочка, комплементарная адаптору, и фермент ДНК-полимераза достраивает фрагмент древней ДНК по имеющейся матрице. В результате получается двухцепочечный фрагмент, к которому присоединяется еще одна пара адапторов.

Главное преимущество нового метода в том, что теперь каждый фрагмент ДНК имеет не один, а два шанса попасть в библиотеку. А учитывая то, что разрывы и другие повреждения практически не мешают адапторам присоединяться к исследуемой ДНК, представительность библиотеки, сделанной этим методом, возрастает не вдвое, а гораздо больше. Геном денисовского человека, прочитанный с помощью метода Мейера, имел 30-кратное покрытие – лучше, чем у первого генома современного человека, секвенированного лишь немногим более десяти лет назад.



Палеогенетические данные позволили по-новому взглянуть на родословную человечества. Это эволюционное дерево, отражающее предположительные «родственные» взаимосвязи между современными людьми, неандертальцами и денисовцами помещены, построено на основе результатов расшифровки геномов. Красными стрелками отмечены доказанные пути притока генов в результате скрещивания между древними человеческими популяциями, черными – возможные дополнительные пути.

По: (Lalueza-Fox and Gilbert, 2011)



этих методов сейчас возможно практически полностью определить последовательность ДНК из единственной живой клетки, а добыть достаточное для анализа количество материала из музейных или ископаемых образцов не очень древнего возраста считается у специалистов делом тривиальным.

Поэтому и радуют нас ученые сообщениями то о расшифровке генома неандертальцев, которая дает возможность судить об их цвете волос, группе крови и даже эмоциях, то о возможности восстановления таких вроде бы безвозвратно исчезнувших видов, как мамонт, дронг или сумчатый волк. Прочитать геном сегодня стало делом техники, полностью же синтезировать его станет вполне возможным уже в ближайшем будущем – это вопрос времени и цены. Останется лишь найти способ внедрить его в клетку и вырастить эмбрион.

Неудивительно поэтому, что в число достижений года журнал «Science» включил работу М. Мейера, которая, на первый взгляд, не раскрывает фундаментальных научных проблем. Однако эксперты журнала посчитали, что методика Мейера значительно продвигает исследования в расшифровке древней ДНК, к тому же первым приложением нового метода стало достаточно подробное прочтение генома денисовского человека – загадочной эволюционной ветви наших предков, открытой на Алтае археологами из новосибирского Института археологии и этнографии СО РАН.

Отечественные ученые не остаются в стороне от мировых тенденций. Так, в изучении денисовцев и остатков ископаемых животных из той же Денисовой пещеры принимают участие специалисты из разных научных центров СО РАН. А в Институте химической биологии



В Национальном музее естественной истории (Вашингтон, США) стоит забавный автомат, где любой желающий может получить свою фотографию, которую компьютер модифицирует, используя реконструкции лиц неандертальцев, сделанных на основе изучения ископаемых останков и палеогенетических исследований. Вот так автор публикации выглядел бы около 40 тыс. лет назад, будучи неандертальцем. Фото из архива автора

и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск) эксперты в области репарации пытаются приспособить соответствующие ферменты для исправления перед анализом повреждений в древней ДНК.

Кстати сказать, сходные проблемы имеются и в практических областях: в медицине (как изучить геном раковой опухоли, давно удаленной у пациента и законсервированной в формалине?), в криминалистике (как проанализировать ДНК из куска обгоревшей кости?) и даже в пищевой промышленности (как определить после всех стадий глубокой переработки сырье, из которого сделана колбаса?).

Это ли не волшебная мечта – создать технологию, которая позволит и определить цвет глаз неандертальца, и поймать преступника?

Редакция благодарит д.и.н. М.В. Шунькова (Институт археологии и этнографии СО РАН, Новосибирск) за помощь в подготовке публикации

© Д.О. Жарков, 2013