

На правах рукописи



Дрёмов Станислав Вячеславович

**ГЕНОМНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ У БЕРЕГОВЫХ ЧУКЧЕЙ,
ЭСКИМОСОВ И КОМАНДОРСКИХ АЛЕУТОВ**

03.01.07 – молекулярная генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2016

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики человека Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Научный
руководитель:

Сукерник Рем Израилевич

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной генетики человека, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Оппоненты:

Серов Олег Леонидович

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетики развития, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Воронина Елена Николаевна

кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории фармакогеномики, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Ведущее
учреждение:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва.

Защита состоится: 1 марта 2017 г. в 14:00 часа на заседании диссертационного совета Д003.074.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук; 630090, Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 8/2; тел: (383)-373-02-49; e-mail: ovant@mcb.nsc.ru. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.mcb.nsc.ru. Автореферат разослан «20» декабря 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



О.В. Антоненко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. С позиции популяционной генетики современные береговые чукчи, азиатские эскимосы и командорские алеуты представляют собой первичные антропологические изоляты в стадии распада и ускоренной ассимиляции. Между тем они всё ещё остаются богатейшим источником генетической информации для реконструкции эволюционных событий на стыке Северо-Восточной Евразии и Америки, поскольку связаны генетической непрерывностью и культурной преемственностью с населением древней Берингии.

На сегодня в поисках генетических корней американских индейцев детальному ОНП-анализу были подвергнуты более 2000 индивидуальных геномов автохтонов Сибири и Севера. Однако характер и последовательность миграций в районе Сибири и Аляски, связанных с процессами заселения американского континента человеком, до сих пор не установлены в полной мере. Развитие технологий выделения древней ДНК и массового параллельного секвенирования и генотипирования обозначило новый виток в изучении популяционной истории человека.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы – исследовать изменчивость ядерной и митохондриальной ДНК у береговых чулков, наукальских, чаплинских и сирениковских эскимосов, а также алеутов Командорских островов для выяснения генетической истории коренных обитателей северо-восточной оконечности Сибири и прилегающих районов Северной Америки.

Для достижения поставленной цели ставились следующие задачи: (1) выяснить состав и происхождение материнских филологических линий данных популяций; (2) определить время коалесценции для материнских линиджей; (3) оценить вклад исследуемых популяций в генетическую историю коренных народов Сибири и Северной Америки.

Научная новизна и практическая ценность. Получены новые данные о геномном разнообразии коренных жителей Крайнего Северо-Востока Азии, связанных генетической преемственностью с обитателями древней Берингии, уточнены истоки и время дивергенции мтДНК-гаплогрупп, характерных для береговых чулков, эскимосов и алеутов. Результаты имеют междисциплинарное значение и могут быть использованы для решения задач популяционной биологии, антропологии, истории народов Сибири и Америки, а также для получения достоверных оценок при идентификации личности у коренных жителей Сибири в судебно-медицинской практике.

Положения, выносимые на защиту. Митохондриальный и ядерный геном береговых чулков, азиатских эскимосов и командорских

алеутов содержит в себе информацию, которая позволяет уточнить популяционную историю последних обитателей древней Берингии.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, Россия, 2013), на межлабораторном семинаре гарвардской медицинской школы (Бостон, США, 2014). Результаты диссертационной работы включены в отчёты о научно-исследовательской работе по грантам РФФИ (№09-04-00183, №12-04-01851).

Вклад автора. Автор самостоятельно выполнил пробоподготовку ДНК для секвенирования и генотипирования, а также филогеографический, статистический и био-информатический анализ генетических данных. Сборы демографических данных, родословных и проб крови были проведены ранее, в процессе многократных экспедиций, выполненных в основном Р.И. Сукерником и Е.Б. Стариковской. При секвенировании мтДНК автору помогал И. В. Морозов. Генотипирование проб ДНК на биочипах было выполнено совместно с сотрудниками лаборатории популяционной и медицинской генетики, Гарвардская Медицинская Школа, г. Бостон, США (заведующий лабораторией: доктор Д. Райх).

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения и заключения, а также выводов и списка цитируемой литературы, в котором содержится 111 ссылок. Работа изложена на 100 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы, 19 рисунков и 5 приложений.

Публикации. По результатам и проблематике настоящего исследования опубликовано 3 работы, из них 3 статьи в рецензируемых изданиях рекомендованного перечня ВАК.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Величина и состав выборки. Образцы крови среди эскимосов, чукчей и алеутов собраны сотрудниками лаборатории молекулярной генетики человека в ходе экспедиций, выполненных в 1994 (п-ов. Чукотка, пос. Новое Чаплино), 1995 (п-ов. Чукотка, пос. Сиреники, пос. Провидения), 2007 (Чаунский район, Чукотский автономный округ, пос. Айон, пос. Рыткучи, пос. Янранай) и 2009 (Петропавловск-Камчатский и Елизовский район) годах (рис. 1). В качестве потенциальных доноров отбирали людей среднего и старшего возраста, в родословных которых нет общих предков на глубину, как минимум, трёх поколений, а все материнские предки которых не смешаны с другими популяциями. Все пробы крови из вены были взяты с добровольного письменного согласия доноров.



Рисунок 1. Географическое расположение исследуемых популяций.

Полногеномному секвенированию митохондриальной ДНК подвергли пробы от 28 береговых чукчей, 19 эскимосов и 5 алеутов. Общая выборка для анализа мтДНК составила 204 образца: 52 новые последовательности получены в ходе настоящей работы и 152 опубликованы ранее.

Данные генотипирования на ДНК-микрочипах Affymetrix Human Origins (по 594,924 ОНП на каждый образец) для 2273 образцов из 208 популяций, включая результаты генотипирования 27 береговых чукчей, 30 сибирских эскимосов и 12 командорских алеутов взяты из [Lazaridis et al., 2014]. Результаты генотипирования для популяций Северной Америки (кри (n=13), алгонкинов (n=9), оджибве (n=17)) не представленных в [Lazaridis et al., 2014] взяты из данных, опубликованных в [Reich et al., 2012].

Методы. Молекулярно-генетический анализ включал в себя выделение и очистку ДНК, амплификацию фрагментов мтДНК и секвенирование полных последовательностей митохондриальной ДНК методом Сэнгера.

Анализ секвенограмм и выравнивание последовательностей относительно референсной последовательности RSRS (revised sapiens reference sequence) [Behar et al., 2012] осуществляли в программе Unipro UGENE v1.11. [Okonechnikov et al., 2012]. Определение гаплотипов мтДНК доноров производили в соответствии с номенклатурой PhyloTree build 16 [van Oven and Kayser, 2009]. Структуру филогенетических деревьев получали при помощи программы mtPhyl v4.015.

Вычисление времени коалесценции мтДНК производили двумя методами: 1) ρ -статистика [Forster et al., 1996] при помощи mtPhyl v4.015, стандартную ошибку считали как описано в [Saillard et al., 2000]; 2) ML-статистика [Achilli et al., 2013] при помощи BEAST v1.8.1. Нуклеотидные позиции m.16182A>C, m.16183A>C, m.16194A>C и m.16519A>N исключены из анализа из-за их высокой вариабильности. Генетическое расстояние было переведено в годы принимая скорость мутирования митогенома за 2.67×10^{-8} замен на сайт в год [Fu et al., 2013].

В качестве исходных данных для анализа ядерной ДНК выступали результаты генотипирования на ДНК-микрочипах Affymetrix Human Origins, по 594,924 ОНП на каждый образец [Lazaridis et al., 2014]. Для проведения PCA в настоящей работе использовали программу smartpca из пакета EIGENSOFT 6.1.1 [Patterson et al., 2006]. Для вычисления f_3 -статистики написана собственная программа. Формулы для расчёта статистики с нормализацией и Z-значений взяты из [Patterson

et al., 2012]. Данные для построения кривых распада неравновесно сцепленных генов получали при помощи программы alder v1.03 [Loh et al., 2013]. Различные модели для выявления информации об оптимальном количестве предковых популяций проверяли при помощи ADMIXTURE v.1.3.0 [Alexander et al., 2009].

Написанные автором и использованные в настоящей работе Node.js/Javascript- и R-скрипты, включая реализацию f_3 -статистики, все скрипты для автоматизации запуска и графического изображения результатов биоинформатических анализов, а также конфигурационные файлы для настройки рабочего окружения расположены по адресу <https://github.com/stasundr/lhmg>.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные, полученные в результате генотипирования ядерной ДНК 2312 образцов из 211 популяций, в том числе 27 береговых чукчей, 30 сибирских эскимосов и 12 командорских алеутов, исследовали биоинформатическими и статистическими методами.

Для выявления структуры в популяциях, а также поиска близкородственных образцов и образцов имеющих не автохтонную генетическую примесь, применяли метод главных компонент (рис. 2). Этот метод также позволил визуализировать положение древних образцов эскимосских культур Саккак, Дорсет и Туле.

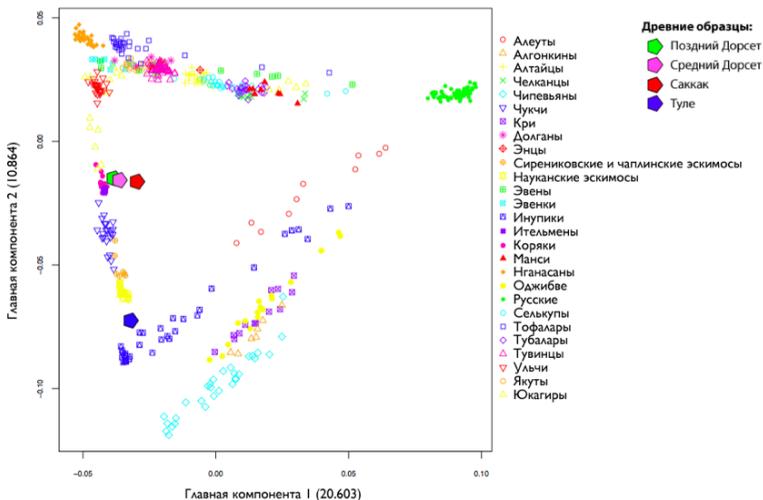


Рисунок 2. График PCA, изображающий популяции в пространстве первых двух главных компонент.

Для уточнения и дополнения результатов PCA вычисляли f_3 - и ALDER-статистику. ALDER-статистика показала, что на протяжении не менее 200 последних поколений чукчи не имели значительной инородной генетической примеси, кроме той, что была получена от коряков, ительменов, юкагигов и эскимосов. Аналогичная ситуация наблюдалась для эскимосов.

Основные генетические компоненты (K) определяли при помощи алгоритма ADMIXTURE. При $4 \leq K \leq 5$ с юга на север чётко прослеживается градиент восточноазиатского компонента вдоль восточного побережья Тихого Океана в сторону убывания. Американский компонент, напротив, возрастает; при этом у алеутов данный компонент выражен слабо. Европейский компонент у чукчей и эскимосов отсутствует, но присутствует в значительной мере у алеутов и в племенах индейцев кри, оджибве, чипевьянов и алгонкинов. При $K=6,7$ проявляется сибирский компонент, из которого выделяется специфический чукотско-камчатский, преобладающий у чукчей, ительменов, коряков и эскимосов, и встречающийся у юкагигов и ульчей при $8 \leq K \leq 12$. Отдельно стоит отметить тубаларов, селькупов и, в меньшей степени, манси, у которых наблюдается небольшая порция североамериканского компонента даже при увеличении K.

Геномная изменчивость митохондриальной ДНК. Пробы крови от 52 доноров (28 чукчей, 19 сибирских эскимоса и 5 алеутов) были отобраны из коллекции ранее собранных образцов [Starikovskaya et al., 1998; Derbeneva et al., 2002; Volodko et al., 2008] для полногеномного анализа митохондриальной ДНК. Полученные последовательности были объединены со 152 митогеномами, обнаруженными на территории Берингии (в северо-восточной Сибири, на Аляске, в северо-западной Канаде и Гренландии) и опубликованными ранее [Ingman et al., 2000; Derbeneva et al., 2002; Starikovskaya et al., 2005; Ingman and Gyllensten, 2007; Tamm et al., 2007; Gilbert et al., 2008; Volodko et al., 2008; Sukernik et al., 2012; Achilli et al., 2013; Raghavan et al., 2014; Lopopolo et al., 2016]. Общая выборка составила 204 мтДНК, среди которых абсолютное большинство ($n=196$) попадает в гаплогруппы A2a, A2b, D2a (рис. 5) и D4b1a2 (рис. 6). Именно эти гаплогруппы стали предметом детального рассмотрения. 8 последовательностей, принадлежащих гаплогруппам C4b2, C5a2 и D3, были исключены из анализа, так как, по всей видимости, привнесены со стороны юкагигов и/или эвенов [Volodko et al., 2008; Sukernik et al., 2012]. Для полноты проводимого исследования в выборку также включены древние митогеномы и все доступные последовательности, относящиеся к гаплогруппам A2a, A2b, D2a и

D4b1a2, чьи носители принадлежат к другим географическим регионам (приложение 3 к диссертации).

Гаплогруппы A2a и A2b. Из 204 мтДНК, обнаруженной по обе стороны от Берингова Пролива, 108 образцов (52,9%) попадают в различные подгруппы гаплогрупп A2a (рис. 3) и A2b (рис. 4). В отличие от гаплогрупп A2a1, A2a2 и A2a3, распространённых среди чукчей и эскимосов (как юпиков, так и инупиков), гаплогруппы A2a4 и A2a5 связаны с различными племенами на-дене, апачи и навахо, населяющими юго-запад США. Расчётное время коалесценции для 66 последовательностей, принадлежащих к гаплогруппе A2a, равно $\sim 3,9$ тысяч лет.

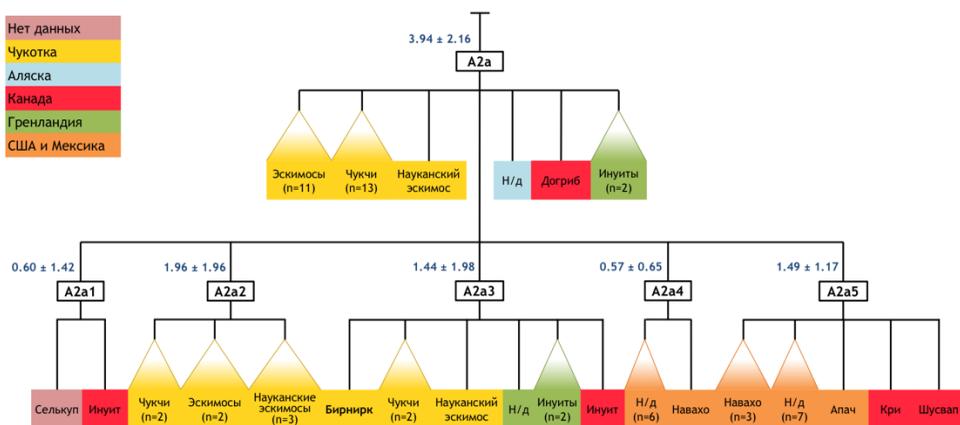


Рисунок 3. Схематическое филогенетическое древо гаплогруппы A2a. Возраст коалесценции гаплогрупп указан в тысячах лет.

Для гаплогруппы A2b, по-видимому, возникшей на территории укрытой сегодня водами Берингова Пролива/Берингова моря, время коалесценции составляет 2,6 тысячи лет – незадолго до разделения и последующего расселения инупиков по Аляске и канадской Арктике.

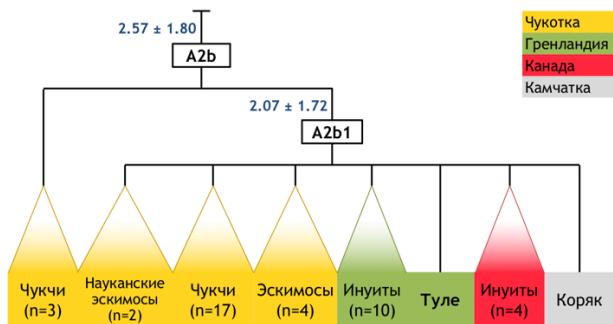


Рисунок 4. Схематическое филогенетическое древо гаплогруппы A2b. Возраст коалесценции гаплогрупп указан в тысячах лет.

Гаплогруппа D2a. Среди 63 последовательностей мтДНК, попадающих в гаплогруппу D2a, 36 принадлежат алеутам Командорских островов, 22 жителям Чукотки, оставшиеся 5 происходят из территории канадской Арктики и Гренландии (рис. 5). Среди них широко представлена гаплогруппа D2a1, определяемая мутацией m.9667A>G. Она объединяет в себе палео-эскимоса Саккак, алеутов из гаплогруппы D2a1a, сирениковских эскимосов из гаплогруппы D2a1b и палео-эскимосов среднего дорсета из ветви D2a1-m.11176G>A.

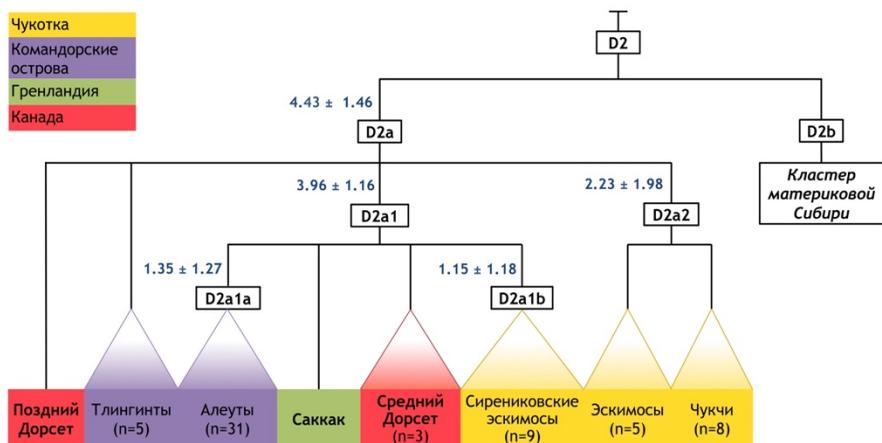


Рисунок 5. Схематическое филогенетическое древо гаплогруппы D2a. Возраст коалесценции гаплогрупп указан в тысячах лет. Древние образцы выделены полужирным шрифтом.

Гаплогруппа D4b1a2. На рисунке 6 приведена часть схематического филогенетического древа восточноазиатской гаплогруппы D4b. Помимо редкого гаплотипа, принадлежащего юкагиру (EU482395.1), происходящего непосредственно от корня D4b1a2, сюда входят две основные субгаплогруппы: D4b1a2a1 и D4b1a2a2, имеющие общую мутацию m.13720C>T.

Географическое распространение мтДНК принадлежащих к D4b1a2 и их временная глубина (8,7 тысяч лет) могут быть связаны с сибирскими популяциями, дифференцировавшимися в алтае-саянском рефугиуме и затем расселившимися вплоть до северо-восточной оконечности Сибири. Это предположение подтверждается тем фактом, что в гаплогруппу D4b1a2a попадают как тубалары, алтай-кижи, буряты и тувинцы, так и юкагиры, чукчи и науканские эскимосы и инуиты Канады и Гренландии.

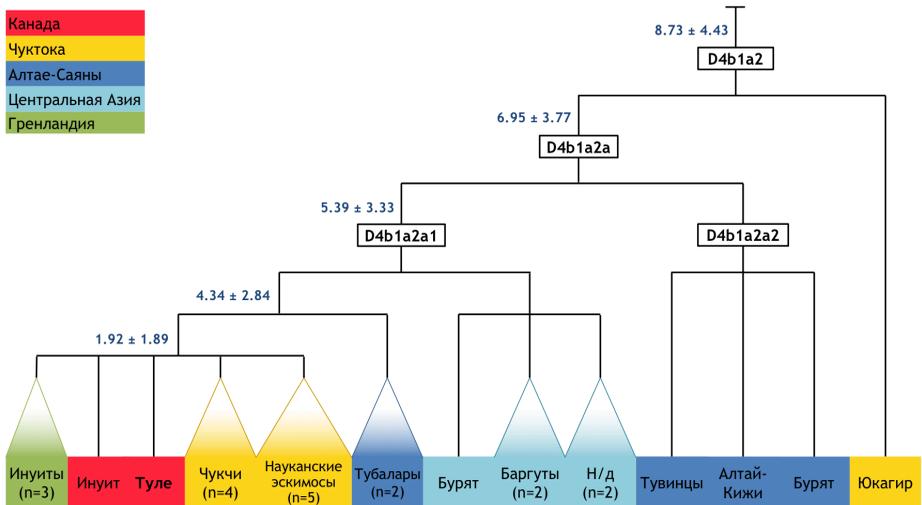


Рисунок 6. Схематическое филогенетическое древо гаплогруппы D4b1a2. Числа над ветвями указывают на возраст коалесценции гаплогрупп (в тысячах лет).

ОБСУЖДЕНИЕ

Во многих работах, посвященных процессу заселения Нового Света, авторы отмечают, что несмотря на большое количество исследований, маршруты, время и характер миграций остаются неизвестными [Tamm et al., 2007; Reich et al., 2012; Raghavan et al., 2014;

Llamas et al., 2016]. Это связано со множеством причин, среди которых изменение климата, повлекшее масштабные изменения ландшафта, флоры и фауны. Следствием этих процессов явилось то, что сейчас исследователям недоступны многие источники данных (немногочисленные археологические стоянки, останки животных и растений того времени погружены под воду или деградированы из-за многократного замораживания и размораживания) [Elias and Crocker, 2008; Raghavan et al., 2014].

Сибирские эскимосы, береговые чукчи и командорские алеуты – последние обитатели Берингии – генетически связаны с населением древней Берингии, а значит несут в себе информацию о событиях, происходивших с их предками не только после, но и до начала последнего ледникового максимума.

Полученные нами результаты отражают многие аспекты популяционной истории Берингии. При этом различный тип наследования митохондриальной и ядерной ДНК значительно влияет на наблюдаемое генетическое разнообразие, что позволяет проводить эволюционные реконструкции, исходя из разных точек зрения.

В настоящее время автохтонные народы, проживающие на территории северо-восточной оконечности Сибири, демонстрируют очень небольшой набор митохондриальных гаплогрупп, специфичных именно для этого региона: A2a, A2b, D2a, D4b1a2a1, а так же C4b2, C5a2 [Starikovskaya et al., 1998, 2005; Volodko et al., 2008; Sukernik et al., 2012; Druonov et al., 2015]. Ближайшими родственниками по материнской линии оказываются эскимосы Канады и Гренландии, а также алеуты Аляски и Алеутских островов [Saillard et al., 2000; Helgason et al., 2006; Gilbert et al., 2008]. Прочие популяции, проживающие относительно недалеко (коряки, ительмены, юкагиры, индейцы на-дене, оджибве, кри, алгонкины) имеют родственный, но чётко отличный пул митохондриальных гаплогрупп [Starikovskaya et al., 1998; Starikovskaya et al., 2005; Volodko et al., 2008; Perego et al., 2010; Achilli et al., 2013].

По результатам исследования ядерной ДНК показано отсутствие значительного потока генов извне в генофонд береговых чукчей и эскимосов на протяжении по меньшей мере 200 поколений, кроме такого от их непосредственных соседей – коряков, ительменов и юкагиров; продемонстрировано чёткое генетическое отличие науканских эскимосов от прочих сибирских эскимосов, а также то, что они, наряду с инуитами Канады и Гренландии, являются потомками неозскимосской культуры Туле.

ВЫВОДЫ

1. Митохондриальный генофонд чукчей, науканских, сирениковских и чаплинских эскимосов, и командорских алеутов представлен гаплогруппами A2a, A2b, C4b2, C5a2, D4b1a2a1, D4b1c/D3, D2a1, D2a1a, D2a1b.
2. Показаны генетические различия в ядерной и митохондриальной ДНК между группами сибирских эскимосов, представляющих палео- и неоэскимосские ветви. Сирениковские эскимосы, носители митохондриальной гаплогруппы D2a1b, вероятно, являются потомками палеоэскимосов по материнской линии, тогда как науканские эскимосы, носители гаплогруппы D4b1a2a1 – потомками неоэскимосов.
3. На основе обнаружения сестринских гаплотипов D4b1a2a1 у тубаларов северного Алтая, науканских эскимосов и канадских и гренландских инуитов, продемонстрирована их генетическая связь, подтверждающая гипотезу о том, что часть генофонда непосредственных предков индейцев Северной Америки возникла в рефугиуме Южной Сибири – Алтае-Саянском нагорье.
4. Возраст возникновения митохондриальных гаплогрупп, полученный при помощи биоинформатических методов, характеризует временную картину распространения их носителей и подтверждается данными радиоуглеродного анализа имеющихся древних образцов. Показано, что палеоэскимосская гаплогруппа D2a1 более чем на две тысячи лет старше неоэскимосской гаплогруппы D4b1a2a1 – m.11383T>C – m.14122A>C – m.16093T>C.
5. На основе анализа ядерной ДНК для береговых чукчей и сибирских эскимосов показано отсутствие значительной генетической примеси на протяжении по меньшей мере 200 поколений, кроме той, что была получена от коряков, ительменов и юкагиров.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Dryomov S.V.**, Nazhmidenova A.M., Shalaurova S.A., Morozov I.V., Tabarev A.V., Starikovskaya E.B., Sukernik R.I. Mitochondrial genome diversity at the Bering Strait area highlights prehistoric human migrations from Siberia to northern North America // *Eur. J. Hum. Genet.* - 2015. - V. 23. - P. 1399-1404.
2. Lazaridis I., Patterson N., Mittnik A., Renaud G., Mallick S., Kirsanow K., Sudmant P.H., Schraiber J.G., Castellano S., Lipson M., Berger B., Economou C., Bollongino R., Fu Q., Bos K.I., Nordenfelt S., Li H., de Filippo C., Prüfer K., Sawyer S., Posth C., Haak W., Hallgren F., Fornander E., Rohland N., Delsate D., Francken M., Guinet J.-M., Wahl J., Ayodo G., Babiker H.A., Bailliet G., Balanovska E., Balanovsky O., Barrantes R., Bedoya G., Ben-Ami H., Bene J., Berrada F., Bravi C.M., Brisighelli F., Busby G.B.J., Cali F., Churnosov M., Cole D.E.C., Corach D., Damba L., van Driem G., **Dryomov S.**, Dugoujon J.-M., Fedorova S.A., Gallego Romero I., Gubina M., Hammer M., Henn B.M., Hervig T., Hodoglugil U., Jha A.R., Karachanak-Yankova S., Khusainova R., Khusnutdinova E., Kittles R., Kivisild T., Klitz W., Kučinskas V., Kushniarevich A., Laredj L., Litvinov S., Loukidis T., Mahley R.W., Melegh B., Metspalu E., Molina J., Mountain J., Näkkäläjärvi K., Nesheva D., Nyambo T., Osipova L., Parik J., Platonov F., Posukh P., Romano V., Rothhammer F., Rudan I., Ruizbakiev R., Sahakyan H., Sajantila A., Salas A., Starikovskaya E.B., Tarekegn A., Toncheva D., Turdikulova S., Uktveryte I., Utevska O., Vasquez R., Villena M., Voevoda M., Winkler C.A., Yepiskoposyan L., Zalloua P., Zemunik T., Cooper A., Capelli C., Thomas M.G., Ruiz-Linares A., Tishkoff S.A., Singh L., Thangaraj K., Villems R., Comas D., Sukernik R., Metspalu M., Meyer M., Eichler E.E., Burger J., Slatkin M., Pääbo S., Kelso J., Reich D., Krause J. Ancient human genomes suggest three ancestral populations for present-day Europeans // *Nature.* - 2014. - V. 513. - P. 409-413.
3. Sukernik R.I., Volodko N.V., Mazunin I.O., Eltsov N.P., **Dryomov S.V.**, Starikovskaya E.B. Mitochondrial genome diversity in the Tubalar, Even, and Ulchi: contribution to prehistory of native Siberians and their affinities to Native Americans // *Am. J. Phys. Anthropol.* – 2012. – V. 148(1). – P. 123-138.