УДК 575.22

Секвенирование полного митохондриального генома древнего человека, представителя новосвободненской культуры, указывает на ее возможную связь с культурой воронковидных кубков

А. В. Недолужко[1*], Е. С. Булыгина[1], А. С. Соколов[1], С. В. Цыганкова[1], Н. М. Груздева[1], А. Д. Резепкин[3], Е. Б. Прохорчук[1,2*]

[1]Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Акад. Курчатова, 1

[2]Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 1

[3]Институт истории материальной культуры РАН, 191186, С.-Петербург, Дворцовая наб., 18

*E-mail: nedoluzhko@gmail.com, prokhortchouk@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 25.12.2013

После доработки 20.03.2014

РЕФЕРАТ **Методом широкомасштабного секвенирования впервые в России проанализирована полная последовательность митохондриального генома древнего человека – представителя новосвободненской археологической культуры. История изучения памятников эпохи ранней бронзы на Северном Кавказе насчитывает более 110 лет. Большинство археологов выделяют здесь единственную майкопскую культуру с двумя этапами развития, сформированную выходцами из Передней Азии в 3700–3600 годах до н. э. Однако характер ряда археологических находок, сделанных в 1979–1991 годах в станице Новосвободная (Республика Адыгея), и их сходство с артефактами культуры воронковидных кубков позволили предположить происхождение, отличное от майкопской культуры. В представленной работе с помощью методов геномного анализа изучены костные останки человека, найденные в районе станицы Новосвободной, возраст которых превышает 5500 лет. Однонуклеотидные полиморфизмы, обнаруженные в митохондриальном геноме этого человека, позволили отнести исследуемый образец к митохондриальной гаплогруппе V7. Таким образом, анализ полной нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК из костных останков, публикуемый в данной работе, в сочетании с результатами изучения археологических артефактов позволяет рассматривать найденные в станице Новосвободная артефакты как самостоятельное явление (археологическую культуру), тесно связанное с культурой воронковидных кубков.**

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА **новосвободненская культура, майкопская культура, гаплогруппа, митохондриальная ДНК, секвенирование.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ **мтДНК – митохондриальная ДНК; ОП – однонуклеотидный полиморфизм.**

ВВЕДЕНИЕ

С конца 1970-х годов по мере накопления археологического материала в научной среде определились две точки зрения на генезис памятников эпохи ранней бронзы на Северном Кавказе. Первая из них предполагает существование единой майкопской культуры с двумя этапами развития [1–3], включая находки, сделанные в станице Новосвободная (бывшая Царская). Вторая гипотеза рассматривает археологические артефакты, найденные в окрестностях станицы Новосвободная, как самостоятельное явление (культуру). В ходе археологических исследований подкурганного могильника «Клады» вблизи станицы Новосвободная, проведенных в 1979–1991 годах под руководством А.Д. Резепкина, были раскопаны 22 кургана, в которых нашли 93 хорошо стратифи-

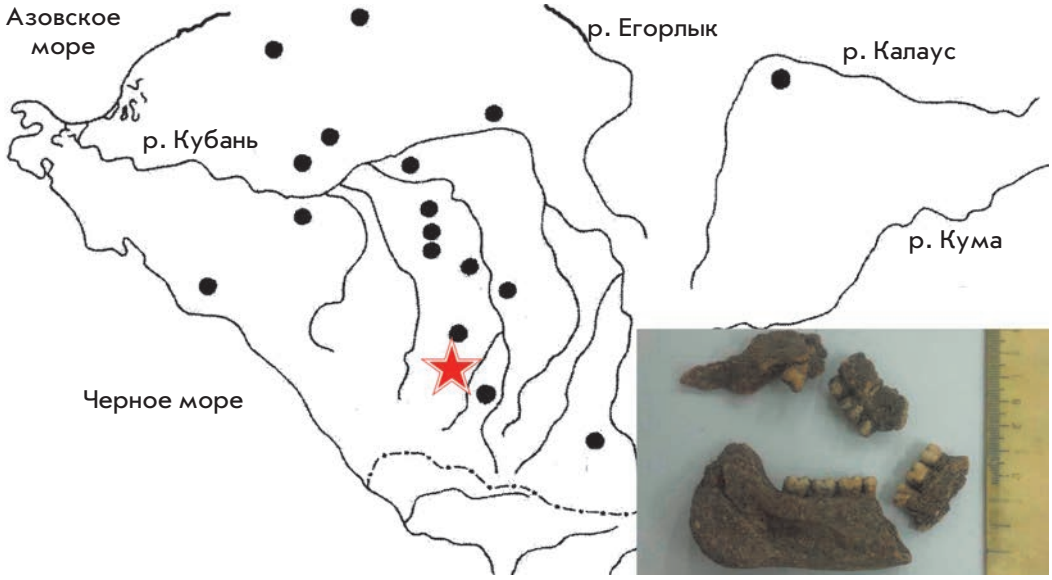

Рис. 1. Ареал новосвободненских памятников на Северном Кавказе (отмечен черными точками). Район раскопок подкурганного могильника «Клады» вблизи станицы Новосвободная в Республике Адыгея (отмечен звездочкой) и костный материал, использованный для выделения ДНК

цированных погребения. Этот материал позволяет не только построить относительную и абсолютную хронологию артефактов Новосвободной, но и вплотную приблизиться к решению проблемы происхождения новосвободненской культуры [4, 5].

В последние годы методы современной геномики широко используются для решения ряда археологических [6–10] и палеонтологических загадок [11–15]. Зачастую в подобных работах анализируют митохондриальную ДНК (мтДНК), особенности которой делают ее незаменимым инструментом изучения эволюции человека: наследование по материнской линии; относительно высокая копийность; быстрое по сравнению с ядерным геномом накопление мутаций; отсутствие рекомбинации; относительно хорошая сохранность этой молекулы в костных останках древних людей, поскольку ядерная ДНК деградирует как минимум в 2 раза быстрее митохондриальной [16, 17].

В данной работе мы представляем полную нуклеотидную последовательность митохондриального генома представителя новосвободненской культуры. Результаты анализа позволяют предположить общность этой культуры с культурой воронковидных кубков. Нами установлено, что представитель новосвободненской археологической культуры принадлежит к митохондриальной гаплогруппе V7.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ДНК была выделена из зубов человека, обнаруженных во время археологических раскопок подкурганного могильника «Клады» вблизи станицы Новосвободная (Республика Адыгея) экспедицией Института истории материальной культуры РАН (Санкт-Петербург). Возраст останков датируется второй третью – концом 4 тысячелетия до н. э. (*рис. 1*).

Выделение ДНК, приготовление и секвенирование ДНК-библиотек

Древнюю ДНК выделяли из растертой в порошок костной ткани человека в специальных условиях, исключающих контаминацию современной ДНК. Использовали протеиназу К (New England Biolabs, США) и кремниевые шарики (Sigma-Aldrich, США) согласно протоколу, описанному Л. Орландо с соавт. [18]. ДНК-библиотеки готовили с использованием набора NEBNext Quick DNA Library Prep Master Mix set for 454 (New England Biolabs), используя адаптерные последовательности для секвенирования на приборах Illumina, согласно стандартному протоколу, предложенному производителем. Качество и концентрацию библиотек определяли с помощью 2100 Bioanalyser (Agilent, США) и HS Quibit (Invitrogen, США). Для обогащения фракции мтДНК использовали набор FleXelect Mitochondrial DNA enrichment kit (Flexgen, Нидерланды) с перекрыванием олигонуклеотидных зондов от 10 до 40% (подробный список олигонуклеотидных зондов для обогащения мтДНК доступен по запросу). ДНК-библиотеки секвенировали на геномном анализаторе Illumina GAIIx с использованием парных чтений (paired-end sequencing), с длиной чтений 50 нуклеотидов.

Биоинформатический анализ

Полученные чтения картировали на митохондриальном геноме (NC_012920.1) с помощью программы Bowtie 2 версии 2.1.0 с параметром very-sensitive [19].

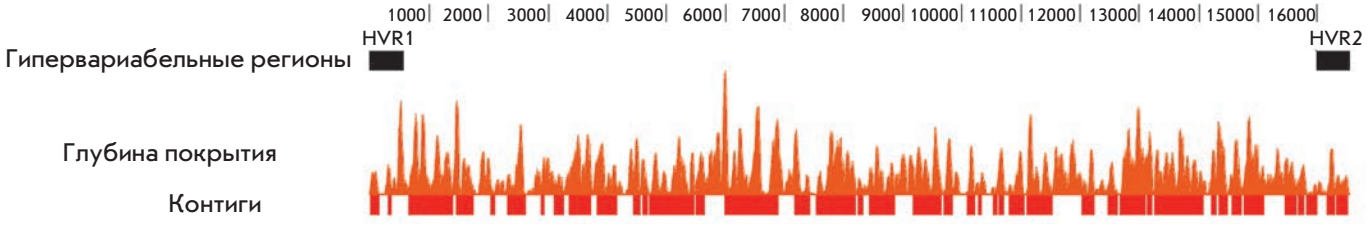

Рис. 2. Результаты секвенирования и сборки митохондриального генома

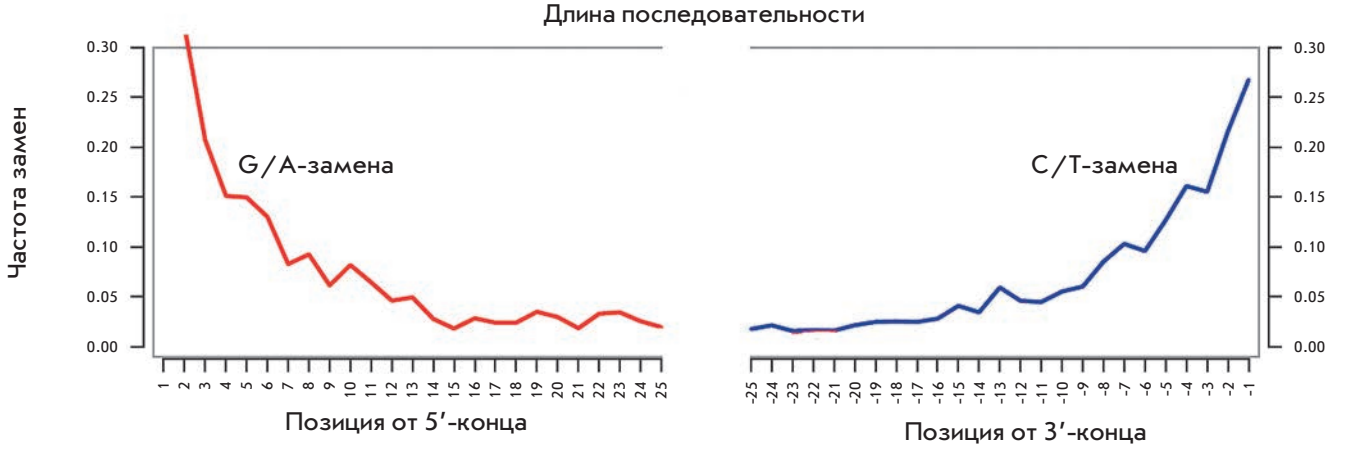

Рис. 3. Частота замен в ДНК-библиотеке. Тест на контаминацию современным генетическим материалом

Тест на древность ДНК проводили с использованием программы mapDamage 2.0 [20]. Согласно модели постмортальных изменений, построенной с помощью данной программы, скорректировано качество тех позиций в чтениях, которые могут содержать модификации. Другими словами, нуклеотидам, которые могут быть результатом замены C → T или G → A, присваивалось худшее значение качества, чем в оригинальном чтении, и они не принимались во внимание при анализе однонуклеотидных полиморфизмов (ОП), характерных для исследуемого образца. Для поиска ОП применяли программное обеспечение VarScan версии 2.2.3, с помощью которого отбирали ОП с $p < 0.01$ [21]. Митохондриальную гаплогруппу определяли по отобранным ОП, используя сервис HaploGrep [22]. *De novo*-сборку митохондриального генома представителя новосвободненской культуры проводили с помощью программы AbySS версии 1.3.6. с длиной K-мера, равной 22 нуклеотидам [23].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из геномных библиотек древнего человека были отобраны последовательности мтДНК. В результате секвенирования обогащенных библиотек получено 58771105 чтений, большая часть которых (99.994%) имела экзогенное (бактериальное) происхождение, что нормально для подобных исследований [24], а также может объясняться сходством геномов бактерий и митохондрий. Картирование чтений на референсный митохондриальный геном (hg19) позволило покрыть его в среднем в 13.4X – всего картировалось 3422 чтения (0.006%) (*рис. 2*).

Известно, что древняя ДНК со временем деградирует до небольших фрагментов, а остатки цитозина (C), расположенные на концах этих фрагментов, дезаминируются до урацила (U) и в ходе подготовки пробы (ПЦР) превращаются в тимин (T) [25]. Частота концевых замен C → T в образцах, чей возраст превышает 300 тысяч лет, может достигать 60% и выше [15, 26]. В то же время при секвенировании современной ДНК уровень концевых замен не превышает 0.5% (данные не приведены). Частоту концевых замен оценивали с использованием программы mapDamage 2.0. В образце из станицы Новосвободная частота концевых замен C → T в 3'- и 5'-концах ДНК-библиотеки превышала 30% (*рис. 3*). Этот результат позволя-

Однонуклеотидные полиморфизмы (ОП ($p < 0.01$)), обнаруженные в митохондриальном геноме представителя новосвободненской культуры

Позиция ОП на мтДНК	Референсная последовательность мтДНК, hg19	Замена	Ген
72*	T	C	-
93*	A	G	-
2515	C	T	TVAS5
9378	G	A	JA760602; JA760600
9541	C	T	JA760602; JA760600
11018	C	T	JA760602; JA760600; STRF6; JA760615
11720	A	G	JA760602; JA760600; STRF6; JA760615
11723	C	T	JA760602; JA760600; STRF6; JA760615
12851	G	A	JA760602; JA760600; JA760615
14906	A	G	JA760602; цитохром b
15302	A	G	JA760602; цитохром b
15477	C	T	JA760602; цитохром b

* ОП, определяющие гаплогруппу V7.

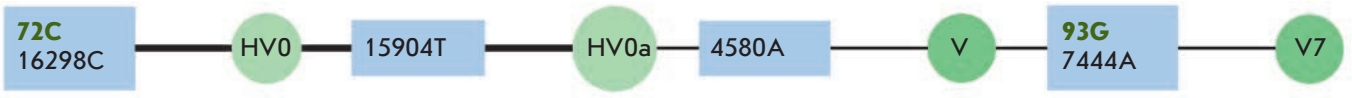

Рис. 4. Результаты определения митохондриальной гаплогруппы, показанные в виде ветви дерева гаплогрупп мтДНК человека (сервис HaploGrep). Зеленым цветом в голубых прямоугольниках указаны ОП (72C и 93G), использованные при определении гаплогруппы

ет утверждать, что в секвенированном образце вся мтДНК принадлежит древнему человеку.

Сравнение нуклеотидных последовательностей индивидуальных чтений с консенсусной последовательностью митохондриального генома (с учетом понижения качества концевых замен, см. «Экспериментальную часть») позволило идентифицировать в мтДНК представителя исследуемой археологической культуры однонуклеотидные полиморфизмы, используя которые мы отнесли образец к митохондриальной гаплогруппе V7 (*рис. 4, таблица*).

При сборке митохондриального генома представителя новосвободненской культуры с минимальной длиной контига, равной 100 нуклеотидам, удалось собрать контиги с N50, равным 203 нуклеотидам (N50 – наибольшая длина контига при *de novo*-сборке такая, что в контигах не меньшей длины содержится 50% суммарной длины контигов).

Общий размер *de novo*-собранных фрагментов мтДНК составил 11063 нуклеотида (*рис. 2*). В связи с деградацией исходного материала, неравномерностью ПЦР и обогащения мтДНК (набор FleXelect Mitochondrial DNA enrichment kit) большинство полученных контигов имели малую длину и не перекрывались, что не позволило обеспечить сборку полной последовательности мтДНК, несмотря на покрытие 13.4X.

Ранее, основываясь на археологических находках, сомнению подвергли точку зрения о связи новосвободненской культуры с переднеазиатской майкопской археологической культурой. Более того, найденные артефакты позволили предложить гипотезу о решающем вкладе в формирование новосвободненской археологической культуры баальбергского варианта ранних этапов предположительно индоевропейской культуры воронковидных кубков, а не переднеазиатской майкопской археологической культуры [5]. Окончательный вердикт в подобных исследованиях позволяет вынести анализ ДНК, который считается одним из решающих доказательств.

Генетические исследования, посвященные миграции древнего человека по территории Европы, активно ведутся в последние десятилетия. Б. Сайкс [27], например, предполагает, что основными митохондриальными гаплогруппами на территории Европы были U, H, V, I, W, T, K, которые появились и распростра-

нились по территории Европы во время таяния ледника 11–14 тысяч лет назад. При этом не исключена миграция с территории Ближнего Востока населения с гаплогруппой J мтДНК, принесшего в регион культуру земледелия [27]. Анализ митохондриальной ДНК представителей культуры линейно-ленточной керамики (предшественника культуры воронковидных кубков) позволил установить доминирование гаплогрупп H, V и T [28]. Кроме того, в ряде работ показано, что в Европе времен археологической культуры линейно-ленточной керамики и родственных ей культур представлены в первую очередь гаплогруппы U, H и V [29–32]. Результаты нашей работы, полученные с использованием современных методов геномного анализа, согласуются с гипотезой о происхождении новосвободненской культуры, предложенной А.Д. Резепкиным [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами представлены результаты секвенирования нуклеотидной последовательности мтДНК представителя новосвободненской археологической культуры, жившего более 5 тысяч лет назад. Обнаруженные однонуклеотидные полиморфизмы позволяют отнести изученный образец к митохондриальной гаплогруппе V7, широко распространенной у современных жителей Европы, а также встречавшейся в ряде культур, населявших Центральную Европу. Результаты работы не противоречат гипотезе о происхождении новосвободненской культуры от ранних европейских культур Северной и Центральной Европы и выделении ее в качестве самостоятельной археологической культуры, однако требуют более детального геномного анализа как новосвободненской, так и майкопской археологических культур. В настоящее время достоверные данные о митохондриальных гаплогруппах майкопской и, предположительно, предковой для нее культуры позднего восточноанатолийского халколита этапов III–IV (Амук F) отсутствуют. ●

Авторы выражают благодарность М.В. Ковальчуку (Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт») за пристальное внимание к работе и К.Г. Скрябину (Центр «Биоинженерия» РАН) за ценные замечания, сделанные в процессе подготовки статьи к публикации.

Работа поддержана РФФИ (грант № 13-06-12025 офи_м) и стипендией Президента Российской Федерации (СП-2056.2012.5).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иессен А.А. К хронологии «больших кубанских курганов». М.: Советская археология, 1950. Т. 12.
2. Мунчаев Р.М. Кавказ на заре бронзового века. М.: Наука, 1975. 416 с.
3. Мунчаев Р.М. Майкопская культура. Археология: Эпоха бронзы Кавказа и Средней Азии. Ранняя и средняя бронза Кавказа. М.: Наука, 1994. С. 158–225.
4. Rezepkin A.D. Das frühbronzezeitliche Gräberfeld von Klady und die Majkop-Kultur in Nordwestkaukasien. Archäologie in Eurasien. M.: Leidorf, 2000. V. 10. 74 S.
5. Резепкин А.Д. Новосвободненская культура (на основе материалов могильника «Клады»). Санкт-Петербург: Нестор история, 2012. 343 с.
6. Paabo S. // Nature. 1985. V. 314. № 6012. P. 644–645.
7. Haak W., Balanovsky O., Sanchez J., Koshel S., Zaporozhchenko V., Adler C., der Sarkissian C., Brandt G., Schwarz C., Nicklisch N., et al. // PLoS Biol. 2010. V. 8. № 11. e1000536.
8. Green R.E., Krause J., Briggs A.W., Maricic T., Stenzel U., Kircher M., Patterson N., Li H., Zhai W., Fritz M.H., et al. // Science. 2010. V. 328. № 5979. P. 710–722.
9. Lorenzen E.D., Nogues-Bravo D., Orlando L., Weinstock J., Binladen J., Marske K.A., Ugan A., Borregaard M.K., Gilbert M.T., Nielsen R., et al. // Nature. 2011. V. 479. № 7373. P. 359–364.
10. Rasmussen M., Guo X., Wang Y., Lohmueller K.E., Rasmussen S., Albrechtsen A., Skotte L., Lindgreen S., Metspalu M., Jombart T., et al. // Science. 2011. V. 334. № 6052. P. 94–98.
11. Ozawa T., Hayashi S., Mikhelson V.M. // J. Mol. Evol. 1997. V. 44. № 4. P. 406–413.
12. Poinar H., Kuch M., McDonald G., Martin P., Paabo S. // Curr. Biol. 2003. V. 13. № 13. P. 1150–1152.
13. Barnes I., Shapiro B., Lister A., Kuznetsova T., Sher A., Guthrie D., Thomas M.G. // Curr. Biol. 2007. V. 17. № 12. P. 1072–1075.
14. Vilstrup J.T., Seguin-Orlando A., Stiller M., Ginolhac A., Raghavan M., Nielsen S.C., Weinstock J., Froese D., Vasiliev S.K., Ovodov N.D., et al. // PLoS One. 2013. V. 8. № 2. e55950.
15. Orlando L., Ginolhac A., Zhang G., Froese D., Albrechtsen A., Stiller M., Schubert M., Cappellini E., Petersen B., Moltke I., et al. // Nature. 2013. V. 499. № 7456. P. 74–78.
16. Pakendorf B., Stoneking M. // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2005. V. 6. P. 165–183.
17. Allentoft M.E., Collins M., Harker D., Haile J., Oskam C.L., Hale M.L., Campos P.F., Samaniego J.A., Gilbert M.T., Willerslev E., et al. // Proc. Biol. Sci. 2012. V. 279. № 1748. P. 4724–4733.
18. Orlando L., Metcalf J.L., Alberdi M.T., Telles-Antunes M., Bonjean D., Otte M., Martin F., Eisenmann V., Mashkour M., Morello F., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 51. P. 21754–21759.
19. Langmead B., Salzberg S.L. // Nat. Methods. 2012. V. 9. № 4. P. 357–359.
20. Jonsson H., Ginolhac A., Schubert M., Johnson P.L., Orlando L. // Bioinformatics. 2013. V. 29. № 13. P. 1682–1684.
21. Koboldt D.C., Larson D.E., Chen K., Ding L., Wilson R.K. // Genome Res. 2012. V. 22. № 3. P. 568–576.
22. Kloss-Brandstatter A., Pacher D., Schonherr S., Weissensteiner H., Binna R., Specht G., Kronenberg F., et al. // Hum. Mutat. 2011. V. 32. № 1. P. 25–32.
23. Simpson J.T., Wong K., Jackman S.D., Schein J.E., Jones S.J., Birol I. // Genome Res. 2009. V. 19. № 6. P. 1117–1123.

24. Garcia-Garcera M., Gigli E., Sanchez-Quinto F., Ramirez O., Calafell F., Civit S., Lalueza-Fox C. // PLoS One. 2011. V. 6. № 8. e24161.
25. Hofreiter M., Jaenicke V., Serre D., Haeseler A., Paabo S. // Nucl. Acids Res. 2001. V. 29. № 23. P. 4793–4799.
26. Dabney J., Knapp M., Glocke I., Gansauge M.T., Weihmann A., Nickel B., Valdiosera C., Garcia N., Paabo S., Arsuaga J.L., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 39. P. 15758–15763.
27. Sykes B. // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 1999. V. 354. № 1379. P. 131-139.
28. Haak W., Forster P., Bramanti B., Matsumura S., Brandt G., Tanzer M., Villems R., Renfrew C., Gronenborn D., Alt K.W., et al. // Science. 2005. V. 310. № 5750. P. 1016–1018.
29. Kittles R. A., Bergen A.W., Urbanek M., Virkkunen M., Linnoila M., Goldman D., Long J.C. // Am. J. Phys. Anthropol. 1999. V. 108. № 4. P. 381–399.
30. Achilli A., Rengo C., Magri C., Battaglia V., Olivieri A., Scozzari R., Cruciani F., Zeviani M., Briem E., Carelli V., et al. // Am. J. Hum. Genet. 2004. V. 75. № 5. P. 910–918.
31. Malmstrom H., Gilbert M.T., Thomas M.G., Brandstrom M., Stora J., Molnar P., Andersen P.K., Bendixen C., Holmlund G., Gotherstrom A., et al. // Curr. Biol. 2009. V. 19. № 20. P. 1758–1762.
32. Skoglund P., Malmstrom H., Raghavan M., Stora J., Hall P., Willerslev E., Gilbert M.T., Gotherstrom A., Jakobsson M. // Science. 2012. V. 336. № 6080. P. 466–469.