

На правах рукописи

**МАЗУНИН
Илья Олегович**

**АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ДНК
ТУБАЛАРОВ ГОРНОГО АЛТАЯ И ЭВЕНОВ ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ**

03.01.07 – молекулярная генетика

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск, 2010 г

Работа выполнена на базе Лаборатории молекулярной генетики человека Института цитологии и генетики СО РАН до 2009г., а затем Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск в соответствии с планом научных исследований этих подразделений.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ: доктор биологических наук, профессор
Сукерник Рем Израилевич
Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН,
г. Новосибирск

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ: доктор биологических наук, профессор
Захаров Илья Кузьмич
Институт цитологии и генетики СО РАН
г. Новосибирск

доктор биологических наук, профессор
Колесников Николай Николаевич
Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН
г. Новосибирск

ВЕДУЩЕЕ УЧРЕЖДЕНИЕ: Институт общей генетики
имени Н.И. Вавилова РАН
г. Москва

Защита диссертации состоится _____ 2010 года на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.045.02 в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН в конференц-зале Института по адресу: проспект акад. Лаврентьева 8, г. Новосибирск, 630090. тел/факс: (383)3333912, e-mail: kokoza@mcb.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной СО РАН.

Автореферат разослан _____ 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е.Б. Кокоза

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. В результате анализа изменчивости митохондриальной ДНК (мтДНК) человека современного вида (ЧСВ) было установлено, что большая часть гаплогрупп, обнаруживаемых в современных популяциях Евразии, была привнесена на континент на протяжении последних 70 тыс. лет в результате ряда последовательных миграций с территории Ближнего Востока и Африки (Mellars, 2006; Pope, Terrell, 2008; Soares et al., 2009; Stanyon et al., 2009). Археологические данные свидетельствуют в пользу заселения южных широт континентальной Сибири популяциями ЧСВ около 43 тыс. лет назад, в эпоху раннего палеолита, однако продвижение вглубь Сибирской Арктики было задержано, вероятно, вследствие резкого похолодания, по данным палеоклиматологии, примерно 32 тыс. лет назад (Pitulko et al., 2004; Goebel et al., 2008; Kuzmin, 2008; Graf, 2009). Относительная изоляция от остальной части Азиатского материка превращает вопросы первоначального заселения Сибири в вопросы первостепенной важности для понимания процессов адаптации человека к суровым условиям, а также установления путей миграции в Северо-Восточной Евразии в период последнего оледенения в направлении Нового Света (Derevianko, Shunkov, 2004; Kuzmin, 2008).

На протяжении многих лет лаборатория молекулярной генетики человека исследует антропологические изоляты Сибири, с целью изучения характера изменчивости мтДНК и поиска «следов» филогенетических линий (A2, B2, C1, D1, D2, D3, D10, X2a), которые заселили Новый Свет (Torroni et al., 1993; Сукерник и др., 1996; Schurr et al., 1999; Starikovskaya et al., 1998, 2005; Derbeneva et al., 2002a, 2002b; Mishmar et al., 2003; Volodko et al., 2008). Однако отсутствие до недавнего времени достаточного количества полных нуклеотидных последовательностей мтДНК коренных жителей Сибири являлось препятствием для использования современных филогеографических подходов. Филогенетические реконструкции, выполненные на основе полных последовательностей, и анализ изменчивости на уровне последовательностей гипервариабельного сегмента мтДНК (ГВС) и ПДРФ-анализа мтДНК послужили основой для уточнения временных рамок и направлений путей миграции отдельных гаплогрупп (Derbeneva et al., 2002; Starikovskaya et al., 2005; Derenko et al., 2007; Volodko et al., 2008).

В настоящей работе проведено исследование разнообразия митохондриальных геномов популяций, населяющих территории горного Алтая (тубалары) на юго-западе Сибири и Приохотья (эвены) на северо-востоке Сибири. Интерес к коренному населению этих областей обусловлен особым интересом к истории заселения северо-восточной Евразии в эпоху палеолита и неолита. Изучение характера изменчивости мтДНК этнически гетерогенного населения северного Алтая позволит лучше понять региональную историю, поскольку Алтай «впитал» несколько волн миграций из центральной Азии (Comas et al., 2004; Lalueza-Fox et al., 2004). С другой стороны, известно, что эвены на протяжении длительного периода времени контактировали с юкагирами, а также русскими старожилами (Jochelson, 1910; Levin, Potapov, 1964; Вахтин и др., 2004). Своевременный молекулярно-генетический анализ популяций тубаларов и эвенов, связанных генетической непрерывностью и культурной преемственностью с автохтонным населением данных территорий, крайне необходим, поскольку в настоящее время наблюдается размывание и исчезновение их уникальных генофондов.

Цель и задачи исследования. Целью работы было проведение сравнительного анализа уникального митохондриального генофонда коренных популяций Сибири, разобщенных территориально – тубаларов горного Алтая и эвенов Нижней Индигирки и Приохотья. Для достижения цели ставились следующие задачи: (1) выяснить состав и происхождение филетических материнских линий у тубаларов и эвенов; (2) оценить возможный вклад протоевразийских популяций в генетическое разнообразие коренного населения Сибири.

Научная новизна и практическая ценность. В настоящем исследовании впервые получены фундаментальные данные по изменчивости мтДНК популяций тубаларов горного Алтая и эвенов Нижней Индигирки и Приохотья. Статистический и филогенетический анализ позволил уточнить генетическую историю их происхождения и внести существенный вклад в реконструкцию эволюционной истории Сибири.

Положения, выносимые на защиту. Митохондриальный геном тубаларов и эвенов содержит уникальный набор гаплотипов, связанных с процессами первоначального заселения северо-восточной Евразии человеком современного вида (ЧСВ).

Апробация работы. Результаты работы были доложены на XX международном конгрессе по генетике «Генетика – понимание живых систем» (Берлин, Германия) в июле 2008 г.; на ежегодном съезде Американского общества генетики (Филадельфия, Пенсильвания, США) в ноябре 2008 г.; на Общеευропейской конференции по генетике человека (Вена, Австрия) в мае 2009 г.

Вклад автора. Автор выполнил экспедиционные сборы у тубалар Горного Алтая (родословные и пробы крови). Экспедиционные сборы среди эвенов Нижней Индигирки и Приохотья выполнены Р.И. Сукерником и Е.Б. Стариковской. Молекулярно-генетический анализ мтДНК выполнен автором. По мере интерпретации результатов и выполнении филогеографического анализа автору помогали Е.Б. Стариковская, Р.И. Сукерник, Н.В. Володько и Н.П. Ельцов.

Публикации. По результатам и проблематике настоящего исследования опубликовано 7 работ.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, методов, результатов, обсуждения, выводов, списка цитированной литературы, содержащего 119 ссылок, из которых 19 на русском языке, а также приложения. Диссертация изложена на 104 страницах машинописного текста, содержит 6 таблиц и 10 рисунков; 2 таблицы содержатся в приложении.

Благодарность. Автор выражает признательность к.б.н. Е.Б.Стариковской, к.б.н. Н.В.Володько, м.н.с. Н.П. Ельцову, ст.лаб. Л.Я.Анохиной и ст.лаб. С.П.Ильиной за всестороннюю помощь в процессе выполнения и оформления диссертационной работы. Данная работа была поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований, проекты № 06-04-48182-а «Генетическая история Берингии, записанная в митохондриальных геномах коренного населения Сибири» и № 09-04-00183-а «Генетическая история северо-восточной Евразии, записанная в митохондриальных геномах коренного населения Сибири».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре приводятся современные представления об использовании мтДНК в качестве генетического маркера при изучении расселения человека современного

вида по земному шару. Показана роль изучения антропологических изолятов для понимания общей картины миграции людей. Поскольку тубалары и эвены являются уникальными популяциями, принадлежащими к древним народам Сибири, и сведения о них можно найти только в специальной литературе, будет целесообразно остановиться на их описании подробнее.

Сведения о тубаларах. Тубалары известны ещё по китайской летописи конца V века. Относительно происхождения тубаларов существует несколько точек зрения, однако наиболее общепринятая принадлежит Л. П. Потапову. Он, изучая историю происхождения северных алтайцев (шорцев, кумандинцев, челканцев и тубаларов), пришел к выводу об их смешанном этническом происхождении при участии самодийских, кетских и даже угрских элементов, а также о присутствии древне-тюркского этнического компонента (Потапов, 1953).

В настоящее время тубалары проживают в Турочакском, Майминском и Чойском районах Республики Алтай, в верховьях реки Бия, а также в г. Горно-Алтайске. По последней переписи населения их численность составляла 1565 человек.

Сведения об эвенах. Многие исследователи, преимущественно ранние, рассматривали эвенов, или тунгусов, как пришельцев из южных районов - с территории Китая, Маньчжурии или из регионов центральной Азии. Но большинство ученых связывает их этногенез с районом Байкала (Васильевич, 1969). По данной концепции, основа древней пра-тунгусской культуры пеших охотников начала складываться в неолите в горно-таежных районах южного Прибайкалья (Восточные Саяны, верховья Енисея и Селенги). Миграция пра-тунгуссов в Приамурье дала основу предкам чжурчженей и маньчжур – по многим данным эти перемещения произошли в конце неолита.

Основная часть эвенов в настоящее время проживает в Якутии, Магаданской и Камчатской областях, Корякском и Чукотском АО, Хабаровском крае. Проживают они также в Приморье, Сахалинской и Амурской областях и за пределами Дальнего Востока. Общее число эвенов составляет 17055 человек, из них вне территории традиционного обитания – около 1300 эвенов, по данным переписи 1989 года.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Величина и состав выборки. Образцы крови тубаларов (147 человек) были собраны предпочтительно у лиц старшей возрастной группы, проживающих в следующих селениях: Урлу-Аспак, Паспаул, Уймень, Кара-Кокша, Инырга, Салганда, Туньжа, Санькин-Аил, Кебезень, Артыбаш, Пыжа, Усть-Пыжа (Чойский и Турочакский район, Республика Алтай) – после выяснения родословной по материнской линии по меньшей мере на глубину трех поколений. Образцы крови эвенов (87 человек) были собраны в поселках: Чокурдах, Хаир, Юкагир, Казачье, Русское Устье – на правом берегу Индигирки в её нижнем течении (Аллаиховский район, Республика Саха), Нелькан и Джигда на реке Майя (Аяно-Майский район, Хабаровский край) и поселках Чумикан, Тугур, Тором, Уда на руке Уда (Тугуро-Чумиканский район, Хабаровский край). Общая выборка составила 230 человек.

Методы. Молекулярно-генетический анализ мтДНК выполнялся в лаборатории молекулярной генетики человека ИХБФМ СО РАН. Молекулярно-генетический анализ включал в себя выделение и очистку ДНК, гаплотипирование образцов и полное секвенирование выборочных митохондриальных геномов (Volodko et al., 2008). Гаплотип мтДНК определяли по сочетаниям диагностических мутаций относительно кембриджской последовательности (Andrews et al., 1999).

Генетические взаимоотношения популяций изучали при помощи факторного анализа, используя частоты гаплогрупп. Факторный анализ проводили при помощи программы STATISTICA 6.0. Дендрограмму строили по методу ближайших соседей (Saitou et al., 1987), используя генетические расстояния D_a , которые рассчитывали по модифицированной формуле Cavalli-Sforza (Takezaki et al., 1996): $D_a = 1 - \sum_1^m \sqrt{x_i y_i}$, где m - число гаплогрупп в популяциях, а x_i и y_i - частоты i -ой гаплогруппы в популяциях x и y . Построение дендрограммы проводили при помощи программы ROPTREE (Takezaki, 1999). Филогенетическое древо полных последовательностей, используя метод максимальной парсимонии, строили при помощи программы mtPhyl, разработанной Н.П. Ельцовым и доступной по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/labs/mtgenome/programs.html>.

Время коалесценции до ближайшего общего предка оценивали при помощи r -статистики (Morral et al., 1994). Стандартное отклонение (σ) определяли согласно

Saillard et al. (2000). Относительные оценки ρ и σ переводили в абсолютное время, используя калибровочную величину, составляющую 5138 лет на одну транзицию в кодирующем районе мтДНК (Mishmar et al., 2003).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Разнообразие гаплотипов мтДНК, выявленных у тубаларов и эвенов.

Тубалары горного Алтая и эвены восточной Сибири – одни из немногих популяций коренных жителей, которые оставались не изученными до настоящего времени с молекулярно-генетической точки зрения. Исследованная выборка образцов крови ($n=230$), собранных от эвенов ($n=87$) и тубаларов ($n=143$), представлена 37 гаплогруппами мтДНК, 20 и 27 для каждой популяции, соответственно. Разнообразие последовательностей мтДНК тубаларов и эвенов представлено в таблице 1. В рамках данной работы были полностью секвенированы 52 генома мтДНК (перечень дан в Приложении 1 к диссертации).

Митохондриальный генофонд тубаларов объединяет в себе как западно-, так и восточно-евразийские гаплогруппы, тогда как мтДНК эвенов относится только к восточно-евразийским вариантам. МтДНК как тубаларов, так и эвенов принадлежит к трем макрогаплогруппам N, R и M, хотя число гаплогрупп относящихся к N и R у эвенов значительно меньше.

Макрогаплогруппа N

Митохондриальный генофонд как тубаларов, так и эвенов имеет в своем составе гаплогруппы относящиеся к макрогаплогруппе N. Однако, макрогаплогруппа N представлена у тубаларов тремя гаплогруппами (A, N9a и X2e), а у эвенов – лишь одной (Y1a). Общая частота встречаемости входящих в макрогаплогруппу N гаплогрупп у тубаларов более чем в два раза превышает таковую у эвенов (12,0% против 5,7%, соответственно). Таким образом, митохондриальный генофонд эвенов обеднен мтДНК, относящейся к макрогаплогруппе N.

Макрогаплогруппа R

Из десяти гаплогрупп, относящихся к R (B1, F1b, F2a2, R9b, HV9, H8, U2e, U4a1, U4b, U5a1) обнаруженных у тубаларов, только одна гаплогруппа (F1b) характерна для эвенов. В общем, макрогаплогруппе R принадлежат 38,5% мтДНК

тубаларов, тогда как только 5,7% мтДНК эвенов являются носителями F1b гаплогруппы, производной макрогаплогруппы R.

Макрогаплогруппа M

Как тубалары, так и эвены имеют в своем митохондриальном генофонде гаплогруппы C, D, Z и G, производные макрогаплогруппы M, в соотношении 50,3% к 88,4%, соответственно.

Гаплогруппа C. Данная гаплогруппа была выявлена у 20,3% тубаларов и 33,3% эвенов, соответственно.

В тоже время, гаплогруппа C2a, имея сравнимую частоту встречаемости (13,9% у тубаларов и 12,5% у эвенов) представлена большим разнообразием у тубаларов, нежели у эвенов. Так, из пяти выявленных в обеих популяциях вариантов гаплотипов гаплогруппы C2a, у тубаларов встречаются четыре варианта, а у эвенов – только два. При этом, один из двух эвенкийских гаплотипов C2a, имеющий ГВС-I-мотив 16223-16298-16327-16497-16519, характерен только для эвенов. Доминирующий гаплотип C2a, имеющий ГВС-I-мотив 16223-16298-16327-16519, был найден у 14 тубаларов и 10 эвенов.

Гаплогруппа C2b (C2b1 и C2b2), также встречается и у тубаларов и у эвенов. Однако, для эвенов характерно большее разнообразие C2b. Так, все семь гаплотипов, охарактеризованных в ходе настоящей работы для гаплогруппы C2b, встречаются у эвенов, причем гаплотип, имеющий ГВС-I-мотив 16171-16223-16298-16327-16344-16357-16519, встречается с наибольшей частотой (семь эвенов). Всего у трех тубаларов нам удалось выявить гаплогруппу C2b: мтДНК всех трех тубаларов имеют разные гаплотипы (две относятся к гаплогруппе C2b1, а одна – к C2b2).

Гаплогруппа C3 обнаружена у 6 тубаларов и 3 эвенов. Стоит отметить, что гаплотипы, образующие данную гаплогруппу, отличаются у эвенов и тубаларов: из четырех выявленных гаплотипов, относящихся к гаплогруппе C3, два характерны только для тубаларов, другие два – для эвенов.

Гаплогруппа C4 была обнаружена лишь у единственного эвена, и не найдена не только тубаларов, но и в других популяциях Сибири.

Гаплогруппа Z. Представлена тремя субгаплогруппами Z1a, Z1a1 и Z1a2, первая из которых была обнаружена у тубаларов, а две другие – у эвенов.

Таблица 1. Разнообразие мтДНК тубаларов и эвенов.

Галло- группы	ПДРФ (ОИП)	ГВС-I (-16000)	Тубалары	Эвены
A	(-/-) 663e	192 223 290 319 362	9	
	(-/-) 663e	179 192 223 290 319 362	1	
X2e	(-/-)(12705) 14465s (15310)	189 223 278 519	1	
N9a	(-/-) (5417 12705)	223 248 257A 261 311 519	6	
Y1a	(+/-) 7933j -8391e	126 189 231 266 519		4
	(+/-) 7933j -8391e	126 179 189 231 266 519		1
B1	(-/-) -6022a (8281d9)	086 136 189 217 519	8	
	(-/-) -6022a (8281d9)	086 136 189 195 217 519	1	
R9b	(-/-) (1541)	145 192 243 304 309 390 519	1	
F1b	(-/-) 4732k -6389w -12406h -12629b	172 189 232A 249 304 519		5
	(-/-) 4732k -6389w -12406h -12629b	189 232A 249 304 311 519	3	
F2a2	(-/-) (10310 10535 10586)	092A 291 304	4	
HV9	(-/-) -14766u (8994)	249 261 311	1	
H8	(-/-) -7025a -14766u (13101C)	288 362	4	
U2e	(-/-) 12308g 15907k	051 129C 189 214 258 362 519	2	
U4a	(-/-) 4643k 12308g (8818)	129 134 356 519	1	
U4b	(-/-) 4643k 12308g (7705 7853 11965 12957)	356 519	11	
	(-/-) 4643k 12308g (7705 7853 11965 12957)	189 356	1	
	(-/-) 4643k 12308g (7705)	311 356 519	8	
	(-/-) 4643k 12308g (7705 7853 11965 12957)	287 356 519	1	
U5a1	(-/-) 12308g (15218)	192 241 256 270 287 304 325 399	9	
C2a	(+/+) -13259o (3816)	223 298 327 519	14	10
	(+/+) -13259o (3816)	223 298 327 497 519		1
	(+/+) -13259o (3816)	223 298 311 327 519	3	
	(+/+) -13259o (3816)	223 291 298 327 519	2	
	(+/+) -13259o (3816)	089 223 291 298 327 519	1	
C2b1	(+/+) -1715c -13259o (12672)	093 129 223 327 519		1
	(+/+) -1715c -13259o (12672)	150 223 298 327 519		1
	(+/+) -1715c -13259o (12672)	093 129 223 298 327 519	1	2
	(+/+) -1715c -13259o (12672)	129 150 223 298 327 519		1
C2b2	(+/+) -13259o (12672)	223 298 327 344 357 519	1	1
	(+/+) -13259o (12672)	171 223 298 327 344 519	1	1
	(+/+) -13259o (12672)	171 223 298 327 344 357 519		7
C3	(+/+) -13259o	223 288 298 327 390 519		1
	(+/+) -13259o	093 189 223 261 288 298 519		2
	(+/+) -13259o	093 223 288 291 298 327 518T 519	5	
	(+/+) -13259o	223 288 291 298 327 518T 519	1	
C4	(+/+) -13259o	219 223 298 327 519		1
Z1a	(+/+) -6749v (5231 10325 15261)	129 185 223 224 260 298 519	2	
Z1a1	(+/+) -6749v (7521 8251 9494 10325 15261)	129 185 223 224 260 298 519		1

Таблица 1. Разнообразие мтДНК тубаларов и эвенов (продолжение).

Галло- группы	ПДРФ (ОИП)	ГВС-I (-16000)	Тубалары	Эвены
Z1a2	(+/+) -6749v (7419 10325 11078 11590 14122 15261)	129 185 189 223 224 260 298 519		1
D2b	(+/+) -5176a (1935 8683 11215 14905)	189 223 362		1
	(+/+) -5176a (1935 8683 11215 14905)	223 291 362		1
	(+/+) -5176a (1935 8683 11215 14905)	129 189 223 362		1
D2c	(+/+) -5176a (5021 11215 15106 15184)	129 223 274 291 311 362		1
D3a1	(+/+) -951j -5176a -10180l 15437e	223 319 362		2
D3a2	(+/+) -5176a -10180l 13717a 14923c	093 172 173 215 223 319 362 519	10	
a1	15437e			
D4a	(+/+) -5176a 10646k (3460)	093 223 232 290 362	1	
	(+/+) -5176a 10646k	093 223 232 261 290 362		1
D4b	(+/+) -5176a 10646k -13268g (13500)	176 223 274 290 319 342 362 519	4	
	(+/+) -5176a 10646k -13268g (13500)	129 176 223 274 290 319 342 362 519	1	
D5a	(-/-) -5176a 12026h (10397 12705)	092 126 164 189 223 266 362	3	
	(-/-) -5176a 12026h (10397 12705)	172 189 223 266 362		1
	(-/-) -5176a 12026h (10397 12705)	092 172 189 223 266 362		2
D5c	(-/-) -5176a (4200T 4216 10397 12705)	129 188+C 193+C 362 390 519	2	
	(-/-) -5176a (4200T 4216 10397 12705)	129 188+C 193+C 311 362 390	1	
	(-/-) (4200T 4216 10397 12705)	129 188+C 193+C 311 362 390	1	
D6	(+/+) -5176a (11696)	223 362	6	
	(+/+) -5176a (11696)	223 362 519		6
	(+/+) -5176a (11696)	223 263 362 519		10
	(+/+) -5176a (11696)	148 223 263 362 519		1
	(+/+) -5176a (11696)	082 147A 223 362	4	
D7	(+/+) -5176a (10427)	223 362 368		2
	(+/+) -5176a (10427)	223 274 362 368		2
	(+/+) -5176a (10427)	223 245 311 362 368	2	
D8	(+/+) -1715c -5176a (8762)	042 214 223 362	3	
	(+/+) -1715c -5176a (8762)	042 093 214 223 362		2
D9	(+/+) 4830n -5176a	223 294 362		3
D4c2	(+/+) -5176a (1462 8383 9431)	223 245 362		1
G1	(+/+) 4830n 8198a	017 129 223 519		2
	(+/+) 4830n 8198a	017 093 129 223 519		4
	(+/+) 4830n 8198a	017 093 129 223 303 519		1
	(+/+) 4830n 8198a	017 093 129 153 223 519		2

Таблица 1. Разнообразие мтДНК тубаларов и эвенов (продолжение).

Гаплогруппы	ПДРФ (ОНП)	ГВС-I (-16000)	Тубалары	Эвены
G2a1	(+/+) 4830n -7598f	223 227 234 278 362 456	1	
	(+/+) 4830n -7598f	223 227 278 362 519	1	
	(+/+) 4830n -7598f	223 227 278 362	1	
Всего			143	87

Примечание: Диагностические сайты в кодирующем районе и ГВС-I выделены жирным шрифтом. Эндонуклеазы рестрикции обозначены однобуквенным кодом: a=AluI; c=DdeI; e=HaeIII; f=HhaI; g=HinfI; h=HpaI; j=MboI; k=RsaI; l=TaqI; n=HaeII; o=HincII; u=MseI; v=AvrII; w=Tsp509I; потеря сайта рестрикции обозначена «-». В случае если мутация транзиция, относительно кембриджской последовательности (Andrews et al., 1999), обозначено только её местоположение, трансверсии обозначены заглавной буквой, соответствующей новому основанию. Наличие дополнительных диагностических мутаций в кодирующем районе, которые невозможно обнаружить с помощью ПДРФ-анализа, были идентифицированы секвенированием (мутация показана в скобках – ОНП, одно-нуклеотидный полиморфизм). Наличие или отсутствие сайтов рестрикции 10394 DdeI / 10397 AluI обозначено (+/+), (-/-) или (+/-); (8281d9) означает межгенную делецию размером 9 пар нуклеотидов в районе cytb/tRNALys.

Стоит отметить, что гаплотип Z1a2 отличается не только наличием дополнительной мутации в положении 16189 в ГВС-I, но как оказалось в результате секвенирования кодирующего района, имеет характерную мутацию 11590. Гаплотипы Z1a у тубаларов и Z1a1 у эвенов, имеют сходный ГВС-I-мотив 16129-16185-16223-16224-16260-16298-16519 и маркированы потерей сайта рестрикции в положении 6749 для ArgV. На этом основании их можно было бы отнести к одному варианту. Однако секвенирование всей нуклеотидной последовательности мтДНК этих индивидуумов позволило выявить существенные различия в кодирующей последовательности. Исходя из нашего опыта, такое встречается редко. Тем не менее, поскольку контрольный регион накапливает мутации значительно быстрее, нежели кодирующий, то идентичность по контрольному району вкупе с основными

диагностическими сайтами, выявляемыми ПДРФ-анализом, является веским (но не абсолютным) основанием для идентификации гаплотипов (без дополнительного секвенирования).

Гаплогруппа D. Эта гаплогруппа представлена огромным разнообразием, как среди тубаларов, так и среди эвенов, составляя, в общем, 26,6% у тубаларов и 42,7% у эвенов.

Гаплогруппа D2 не встречается у тубаларов, но была выявлена у 4 эвенов, относящихся к разным гаплотипам (D2b, D2c).

Гаплогруппа D3 характерна как для тубаларов, так и для эвенов. Двое эвенов имеют минимальный набор мутаций 16223-16319-16362 в ГВС-I и на основании ряда выявленных в результате ПДРФ-анализа диагностических мутаций кодирующего района, были отнесены к D3a1. Десять мтДНК тубаларов по наличию диагностических мутаций в кодирующем и контрольном районах, были отнесены к D3a2a1. Секвенирование двух случайно выбранных последовательностей мтДНК, относящихся к этой гаплогруппе, подтвердило их идентичность.

Гаплогруппа D4a была найдена у одного тубалара и одного эвена. Эвенкийский гаплотип отличался от тубаларского наличием по крайней мере одной мутации в положении 16261 в ГВС-I. Гаплогруппа D4b обнаружена у 5 тубаларов, четверо из которых имели одинаковый гаплотип, пятый отличался одной мутацией в положении 16129 в ГВС-I мтДНК.

Как тубалары, так и эвены имеют в митохондриальном генофонде гаплогруппу D5a2, однако гаплотипы, характерные для D5a2 эвенов отличаются от гаплотипа D5a2, выявленного у тубаларов. Гаплогруппа D5c была выявлена только у тубаларов и представлена тремя гаплотипами.

Гаплогруппа D6 характерна для обеих популяций, однако гаплотипы, составляющие эту гаплогруппу у тубаларов и эвенов отличны. Так, у шести тубаларов был выявлен гаплотип гаплогруппы D6, имеющий минимальный набор мутаций 16223-16362 в ГВС-I. У четырех тубаларов был обнаружен гаплотип, содержащий две дополнительные мутации в положениях 16082 и 16147 в ГВС-I. В общем, мтДНК семнадцати эвенов были отнесены к трем различным гаплотипам гаплогруппы D6.

Гаплотипы гаплогруппы D7 эвенов также отличны от гаплотипов данной гаплогруппы у тубаларов. МтДНК двух эвенов имели сходный гаплотип с мотивом

16223-16362-16368 в ГВС-I, тогда как другие два имели в ГВС-I дополнительную мутацию в положении 16274. МтДНК двух тубаларов, в свою очередь, отличались наличием двух других мутаций в положениях 16245 и 16311 в ГВС-I, помимо мотива в ГВС-I, характерного для гаплогруппы D7.

Гаплогруппа D8 была выявлена у трех тубаларов и у двух эвенов. Оба эвена имели идентичный гаплотип и отличались от тубаларов наличием дополнительной мутации в положении 16093 в ГВС-I.

Гаплогруппа D9a и D4c2 были обнаружены только у эвенов. Причем все три эвена, принадлежащих к D9a, имели идентичный гаплотип по набору мутаций в кодирующем и контрольной регионе. К D4c2 была отнесена мтДНК только одного эвена.

Гаплогруппа G обнаружена у тубаларов и эвенов, однако мтДНК девяти эвенов отнесены к гаплогруппе G1b, которая включает четыре различных гаплотипа, тогда как мтДНК трех тубаларов отнесены к трем различным гаплотипам гаплогруппы G2a1.

Оценка генетические дистанции между 19 популяциями, охватывающими все лингвистические группы аборигенов Сибири, изученных в ходе многолетних исследований нашей лаборатории, были рассчитаны, исходя из частот субгаплогрупп, и затем проанализированы с помощью дендрограммы (рис. 1). Структура дендрограммы подтверждает, что генофонд чукчей и эскимосов сформировался вследствие продолжительной изоляции от географически близких Камчатских популяций – коряков и ительменов. Кластеризация популяций Нижнего Амура и Приохотья относительно популяций западной и средней Сибири указывает на формирование определенной биогеографической группы в районе юго-восточной Сибири, по меньшей мере, в послеледниковое время. Эти результаты согласуются с этапами колонизации северо-восточной Сибири из районов среднего Амура, по антропологическим, археологическим и лингвистическим данным (Krauss, 1988; Janhunen, 1996; Derevianko, 1998). Кластеризация тубалар, кетов и манси является, вероятно, следствием смешения различных генофондов предковых популяций Алтае-Саянского региона.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основываясь на популяционных и филогенетических данных, накопленных в нашей лаборатории, мы полагаем, что древние Сибирские популяции имели неоднородное происхождение. Так, юго-западная Сибирь, представленная в данной работе тубаларами Алтая, имеет как восточные, так и западные мтДНК гаплогруппы. С другой стороны, юго-восточная Сибирь, представленная эвенками Приохотья, имеет только восточные мтДНК гаплогруппы.

Распространение линиджа U4b на северо-востоке Алтая и прилегающем Западно-Сибирском плато делает маловероятным предположение, что это результат недавнего генного потока из Европы, где были обнаружены лишь единичные U4b мтДНК (Achilli et al., 2004; Malyarchuk et al., 2008).

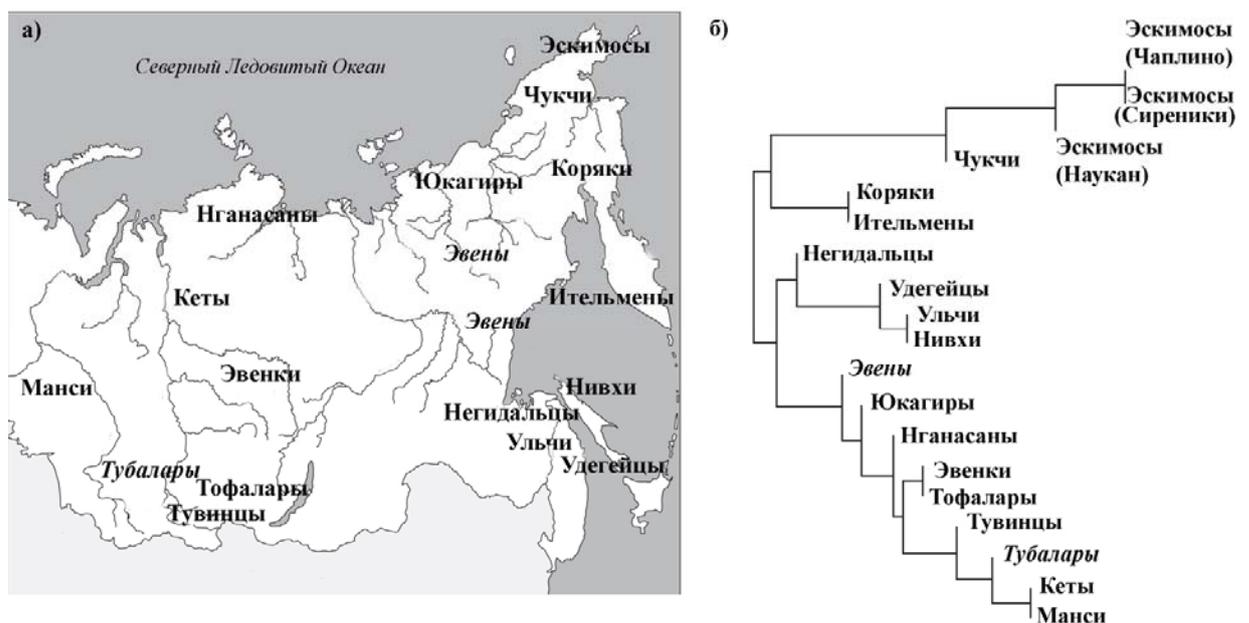


Рисунок 1. (а) карта расселения основных антропологических изолятов Сибири; (б) оценка филогенетических дистанций методом ближайших соседей.

Вероятно, U4b представляет собою остатки верхне-палеолитических миграций, сохранившихся в районе между Уралом и бассейном Оби. Это предположение поддерживается филогенетическим анализом полных секвенированных последовательностей U4b, выполненных в ходе данного исследования (6 мтДНК последовательностей) с привлечением доступных на сегодня мировых данных (16

мтДНК последовательностей). Наличие линиджей U2e, U7 и N2a в этом же регионе (Derbeneva et al., 2002; Derbeneva et al., 2002; Pimenoff et al., 2008) является дополнительным свидетельством данного предположения. Так, полная последовательность мтДНК манси, принадлежащая гаплогруппе U7 (см. приложение 1), как оказалось, содержит уникальный ранее не публиковавшийся мотив 4452-4820-5480-10124-12398-14097-15804.

Филогенетический анализ обнаруженного у тубаларов варианта гаплогруппы X2e показал, что тубаларский вариант представляет собою отдельный сублинидж европейского линиджа и имеет дополнительную мутацию 13327 (Reidla et al., 2003; Shlush et al., 2008). Филогенетический возраст, рассчитанный на основе 5 полных мтДНК-геномов (один тубалар, один телеут, два южных алтайца и один бурят), 4 из которых были описаны ранее (Derenko et al., 2007), составляет не более, чем 3,1 тысячи лет. Таким образом, тубаларский сублинидж X2e-13327 может являться частью генного потока в направлении юго-западной Сибири в эпоху позднего неолита.

В наших предыдущих исследованиях характера изменчивости мтДНК коренного населения Сибири (Torroni et al., 1993; Сукерник и др., 1996; Schurr et al., 1999; Starikovskaya et al., 1998, 2005; Derbeneva et al., 2002a, 2002b; Mishmar et al., 2003; Volodko et al., 2008) было показано, что южный пояс Сибири является ключевым регионом для понимания процессов заселения Америки. Так, почти две трети тубаларского генного пула являются производными основных мтДНК линиджей (A-D), которые характеризуют генетический мтДНК-пул американских индейцев. С другой стороны, у эвенов наблюдается необычайно большое разнообразие суб-линиджей гаплогруппы D (42,7% от общего разнообразия мтДНК эвенов).

Несколько отдельных сублиниджей Z1a, обнаруженных в Сибири в ходе предыдущих и данного исследования, могут быть рассмотрены в свете реколонизации северных широт Евразии, начиная как минимум с эпохи раннего голоцена. Более того, Z1a-740-12930-кластер, имеющий возраст около 2,4 тыс. лет и широко распространенный у кетов, саами, финнов и русских с Волги и Урала, очевидно, является результатом миграции в относительно недавнее время. Основываясь на филогенетическом исследовании и характере распределения последовательностей

гаплогруппы Z (Tanaka et al., 2004; Starikovskaya et al., 2005; Ingman, Gyllensten, 2007), мы полагаем, что данный линидж был сформирован в районе Манжурии-Монголии (Jahunen, 1996) и затем с течением времени распространился в места настоящего обитания.

ВЫВОДЫ

1. Впервые с применением полного секвенирования мтДНК был описан митохондриальный генофонд тубаларов горного Алтая и эвенов восточной Сибири. Первый включает как западно- (HV, U, X), так и восточно- (A, B, C, D, G, Z, N9/Y) евразийские гаплогруппы. В то же время генофонд эвенов представлен исключительно восточноевразийскими гаплогруппами (C, D, G, Z).
2. Гаплогруппа U4b, филогенетический возраст которой составляет около 22 тыс. лет, обнаружена у тубаларов с частотой 14,7%, и, очевидно, представляет собой остатки ранней Верхнепалеолитической экспансии ЧСВ.
3. Гаплогруппа X2e, обнаруженная у тубаларов, очевидно, представляет собою отдельную ветвь возрастом не более 3,1 тыс. лет и является частью генного потока в направлении юго-западной Сибири в эпоху позднего Неолита.
4. Гаплогруппа Z1a имеет возраст около 16,4 тыс. лет, что может свидетельствовать о реколонизации высоких широт Евразии её носителями в раннем Голоцене.
5. У эвенов выявлены редкие, практически исчезнувшие линиджи D2b и D2c, с частотой 3,5% и 1,2%, соответственно.
6. Генетические связи между популяциями Алтае-Саянского нагорья и американскими индейцами демонстрирует кластер D3a2a1, обнаруженный исключительно у тубаларов и эскимосов (включая американских).

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сукерник Р.И., Володько Н.В., Мазунин И.О., Ельцов Н.П., Стариковская Е.Б. Генетическая история изолятов русских старожилов полярного Севера Восточной Сибири по результатам анализа изменчивости мтДНК // Генетика. 2010. Т. 46. № 11. С. 1571-1579.

2. *Ельцов Н.П., Володько Н.В., Стариковская Е.Б., Мазунин И.О., Сукерник Р.И.* Роль естественного отбора в эволюции митохондриальных гаплогрупп Северо-Восточной Евразии // Генетика. 2010. Т.46. № 9. С. 1247-1249.
3. *Мазунин И.О.* Современные представления о структуре и функциях митохондрий // Генетика. 2010. Т. 46. № 9. С. 1241-1243.
4. *Volodko N.V., Starikovskaya E.B., Mazunin I.O., Eltsov N.P., Naidenko P.V., Wallace D.C., Sukernik R.I.* Mitochondrial Genome Diversity in Arctic Siberians, with Particular Reference to the Evolutionary History of Beringia and Pleistocenic Peopling of the Americas // Am. J. Hum. Genet. 2008. V. 82. P. 1084-1100.
5. *I.O. Mazunin, R.I. Sukernik, E.B. Starikovskaya.* Mitochondrial Genome Diversity in Tungusic-speaking Populations (Even and Evenki) and Resettlement of Arctic Siberia After Last Glacial Maximum // European Human Genetics Conference 2009. Vienna, Austria – May 23 – 26, 2009
6. *R. Sukernik, I. Mazunin, E. Starikovskaya, N. Volodko, N. Eltsov.* Early Siberian Maternal Lineages in the Tubalar of Northeastern Altai Inferred from High-Resolution Mitochondrial DNA Analysis // Presented at the annual meeting of The American Society of Human Genetics, November 11-15, 2008, Philadelphia, Pennsylvania.
7. *E.B. Starikovskaya, I.O. Mazunin, N.V. Volodko, D.C. Wallace, and R.I. Sukernik.* The traces of early Eurasians in anthropological isolates of Western and Middle Siberia revealed by mitochondrial DNA analysis // XX International Congress of Genetics “Genetics – Understanding Living Systems”. Berlin, Germany. July 12-17, 2008

МАЗУНИН Илья Олегович

**АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ДНК ТУБАЛАРОВ
ГОРНОГО АЛТАЯ И ЭВЕНОВ ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ**

Автореф. дисс. на соискание учёной степени кандидата биологических наук.
Подписано в печать 27.10.2010. Заказ №84. Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз.
Отпечатано в типографии Института катализа СО РАН
630090 Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 5