

ДРЕВНИЕ МЕДВЕДИ: ПРОЧИТАТЬ ПО КНИГЕ ГЕНОМА

Несколько миллионов лет назад не было ни белых, ни бурых, ни гималайских медведей, но благодаря эволюции и изменениям климата предки косолапых приспособились к условиям среды, разделившись на уже известные нам виды. Узнать о том, как давно существуют те или иные представители этого семейства и насколько они родственно связаны, помогает анализ древней ДНК, который проводится учеными из Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН.

Древнюю ДНК получают из любых археологических или палеонтологических образцов: костных останков, зубов, мумифицированной ткани, шерсти, перьев, скорлупы, зерен растений. В этом ученым помогает так называемая полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный метод, позволяющий добиться увеличения малых концентраций фрагментов ДНК в биологическом материале.

Когда появилась возможность выделять ДНК из древних образцов, начали создаваться науки на стыке разных дисциплин — в том числе археогенетика (или палеогенетика), включающая в себя анализ древней ДНК, где для нового взгляда на археологические образцы используются молекулярные методы.

Впервые древняя ДНК была выделена в 1984 году из музейного экспоната квагги: вымершего вида семейства лошадиных. Сначала методы были малоэффективны, но с развитием ПЦР начались массовые исследования ДНК из древних образцов, в том числе вымерших млекопитающих, динозавров и даже организмов, заключенных в янтаре. Научный мир с оптимизмом воспринял подобные работы, но с применением ПЦР возникла такая проблема, как контаминация — случайное загрязнение объекта чужеродной ДНК.

— Например, динозавры в итоге оказались ближайшими родственниками куриц — хотя, скорее всего кто-то из лаборатории в этот день ел блюдо с таким мясом, — рассказывает младший научный сотрудник лаборатории сравнительной геномики ИМКБ СО РАН Анна Сергеевна Дружкова. — Подобные ошибки связаны с тем, что полимеразная цепная реакция лучше идет на ДНК из современных образцов — ведь у них можно взять кровь или мышечную ткань, и они не подвергались длительному воздействию разрушающих факторов.

Если обладать специальным оборудованием и методами, геном различных животных считывается как открытая книга, однако древние образцы зачастую представляют собой разорванные книги или обрывки страниц с несохранившимися текстами. Иногда в образце просто не сохраняется ДНК — остается только свалка того, что было рядом: информация о почве, выкапывавших образцы людях, принявших участие в разложении микроорганизмах, различных грибах и бактериях. В идеальных условиях расчет сохранности ДНК составляет один миллион лет, но не каждый образец после смерти

попадает в «холодильник» на -74°C . Поэтому когда началась работа с ДНК, ученые прежде всего обращали внимание на образцы из вечной мерзлоты (например, мамонтов) либо из пещер с сухим микроклиматом, благодаря которому организм мумифицировался.

— В наших исследованиях были костные образцы, которые подверглись прохождению через пищеварительный тракт гиен, что тоже воздействовало на ДНК, — добавляет Анна Дружкова. — Чтобы отличить, выделили ли вы ДНК из искомого образца, сидевшего рядом ученого или собаки, которая дома потеряла об его ногу, были придуманы строгие критерии аутентичности. Они подразумевают работу в лабораториях в специальном скафандре, обработку всех поверхностей специальными деконтаминаторами и смену перчаток при каждом соприкосновении с новым образцом.

Для более точного результата при приготовлении геномных библиотек нужно убирать контаминации путем исключения высокомолекулярных фрагментов, так как они относятся к современным организмам. Древняя ДНК деградирует и может содержать от 70 до 120 пар нуклеотидов, в то время как в современной их около 1 000 — даже если учитывать самые мелкие фрагменты. Поэтому можно с уверенностью исключать крупные, не говоря уже о том, что большее покрытие при секвенировании дает возможность отобрать нужные последовательности в спорных моментах, которые ученые считают контаминациями.

— Когда мы начали свои работы с древней ДНК, возник вопрос, где брать образцы, и здесь нам помог Институт археологии и этнографии СО РАН, — добавляет исследовательница. — В нем есть коллекции костей различных млекопитающих, с помощью которых реально восстановить эволюционную историю какого-либо вида. Для нашего исследования были взяты образцы медведей — бурых и вымерших малых пещерных. Насчет последних возникло много споров: другие генетики уже исследовали костные образцы с Алтая и утверждали, что там обитали только бурые медведи. Однако на основании морфометрических показателей наши коллеги считали, что на Алтае жили и другие виды.

Часть образцов была взята из Денисовой пещеры — места, благодаря микроклимату хорошо сохраняется ДНК. Также использовались кости, вымытые на берега сибирских рек Чумыш и Чик. Возраст образцов оттуда составил примерно 32 000 лет, и, несмотря на то, что кости почернели и плохо сохранились, современные методы позволили получить митохондриальный геном даже из них.

— Чтобы выделить ДНК, мы используем широко распространенный способ, — поясняет Анна Дружкова. — Для начала убираем верхний слой кости (где больше всего контаминаций) с помощью алмазного диска, измельчаем небольшой фрагмент в пудру и растворяем в специальном растворе, очищая от препятствующих ПЦР загрязнений. Естественно, из древнего образца выделяется всё, что находилось рядом: грибы, бактерии, люди.

Содержание митохондриальной ДНК в образце невелико, так как определенное место занимает ядерная ДНК и различные контаминации.

Поэтому ученые используют протокол обогащения с помощью зондов (фрагментов) из ДНК современного образца этого же либо близкородственного вида. К современной ДНК как к магниту притягиваются наиболее похожие фрагменты древней, содержащие уникальные бар-коды — словно одинаковые бирки, по которым в ходе биоинформационного анализа можно отсортировать все последовательности из древнего образца и не спутать с современным, взятым для обогащения. Таким образом из всей смеси ДНК из древнего образца ученые «вытягивают» искомые митохондриальные фрагменты.

— Бурые медведи, которые фигурировали в нашем исследовании, действительно относятся к бурым, без погрешностей, — подчеркивает исследовательница. — То же самое с пещерными. Это важный результат, ведь молекулярно доказано, что на территории Западной Сибири обитали представители разных видов из семейства медвежьих.

Благодаря очистке от контаминаций и обогащению библиотек для секвенирования ученым удалось собрать митохондриальные геномы и построить филогенетическое дерево, отражающее эволюционные взаимосвязи между разными представителями медвежьих. Дело в том, что в результате последнего ледникового максимума небольшая группа бурых медведей расселилась по всей Евразии. Исследователям из ИМКБ СО РАН удалось показать, что на территории Сибири жили представители из более ранних миграционных волн, следы которых остались в современных популяциях медведей Японских островов и Аляски. Так, алтайские медведи из раскопа Колывань возрастом в 3 500 лет и из Денисовой пещеры возрастом в 5 000 лет входят в заключительную волну мигрантов, расселившихся в последние 10 000 лет, а медведь с реки Чумыш, которому 32 000 лет, относится к предпоследней миграционной волне, прошедшей 30–50 тысяч лет назад.

— Еще у нас был медведь возрастом около 32 000 лет с реки Чик, — рассказывает Анна Дружкова. — Он также принадлежит к группе бурых медведей, наиболее близких к современному белым и бурым, которые сейчас встречаются на островах

Адмиралтейском и Баранова. Когда мы поняли, что данных по современным медведям в Сибири недостаточно, так как территория очень большая, коллеги поделились с нами современным образцом из Иркутска. Мы сделали по нему обогащение, и выявили, что он тоже относится к этой уникальной группе из предпоследней миграционной волны, — один из сорока современных медведей оказался с таким уникальным гаплотипом!

По ранее полученным расчетам общий предок с бурыми и пещерными медведями жил около трех миллионов лет назад. На основании исследования ученых из ИМКБ СО РАН можно утверждать, что бурые медведи, которые существовали на территории Сибири, были очень разнообразны, и их следы реально найти по всему современному ареалу обитания.

Самыми первыми от общего предка отделились американские и тибетские медведи, а потом уже пещерные, белые и следом — все бурые. На многие преобразования повлияли климатические изменения и ледниковые периоды, поэтому ареалы обитания бурых и белых смешивались. Однако белые были отдельным видом порядка 700 000 лет назад по теоретическим расчетам на основании анализа ядерных генов современных медведей.

Сибирские ученые использовали гризли и гималайского медведя как аут-группу (наиболее близкородственные виды), но они находятся на далеко лежащей ветви. По митохондриальной ДНК также встречается родство бурых медведей с белыми, однако если смотреть на ядерную, становится ясно, что белые — однозначно более ранняя отделившаяся ветвь. Поэтому с пещерными медведями может быть то же самое, ведь митохондриальная ДНК дает информацию только по материнской линии. Пока нельзя сказать, что малые пещерные медведи — отдельный вид среди пещерных, но точно можно утверждать — они действительно отличаются от бурых.

Алёна Литвиненко
Фото предоставлено
Анной Дружковой



Сверху — нижняя челюсть бурого медведя, снизу — нижняя челюсть малого пещерного медведя