**Введение­­**

Изучение взаимоотношений различных этнических групп на протяжении эволюционной истории человека является одним из ключевых направлений популяционной генетики и основывается на анализе особенностей геномного разнообразия отдельных популяций. Обширная территория Сибири и Дальнего Востока и низкая численность коренного населения способствовала формированию значительной популяционной обособленности. Коренное население, зачастую, развивалось в условиях длительной генетической изоляции от основных миграционных потоков на территории Евразии, что делает его генофонд особенно интересным для изучения этапов заселения человеком современного типа не только Сибири и Дальнего Востока, но и Нового Света. В виду этого, коренные народы очень разнообразны по антропологическому и языковому составу, а также этнической истории. Так, нивхи – малый коренной народ нижнего течения реки Амур и острова Сахалин на протяжении нескольких столетий сохранял свою генетическую и культурную идентичность, не смотря на разнообразие близлежащих популяций (айны, ороки, ульчи, японцы) и активную ассимиляционную политику со стороны русского государства. На сегодняшний день накоплено недостаточно материала о генетическом составе популяций Дальнего Востока(ссылка), в том числе генетическая история нивхов, их происхождение и современное состояние генофонда остается малоизученной.

В тоже время, накопленные данные не могут точно описать реальную структуру генофонда и взаимоотношения популяций данной территории. Главным образом это связано с тем, что малочисленная выборка нерепрезентативна по отношению ко всему генофонду изучаемых народов. В следствии чего по-прежнему остаются вопросы о вкладе различных предковых популяций в современный генофонд Дальнего Востока. Для получения наиболее достоверных результатов необходимо объединить как можно больше доступных генетических образцов по изучаемым этносам. Удобным источником информации для характеристики структуры генофондов современных популяций и анализа эволюции популяций человека являются однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) (Kim S., Misra A. 2007). Генотипирование на ДНК-микрочипах – оптимальный подход к выявлению однонуклеотидных полиморизмов в геноме человека

Цель работы: на основе разнообразия генофондов по однонуклеотидным полиморфизмам осуществить реконструкцию генетических взаимоотношений между Нивхами и коренными этническими группами Северо-Восточной Сибири

Задачи:

1.

**1. Обзор литературы**

**1.1 Генетическое разнообразие населения Дальнего Востока**

Внимание исследователей всегда было сосредоточено на реконструкции процессов происхождения человека и его расселение по земному шару[1],[2]. Однако сейчас становятся все более актуальными работы, связанные с конкретизацией эволюционных процессов отдельных этносов [3], [4], [5].

Ряд исследований, основанных на анализе митохондриальной ДНК (мтДНК) и Y-хромосомных маркеров, направлен конкретно на изучение истории Сибирского населения [6], [7], [3], [4], [5], [8], [9]. В последнее время все большее внимание уделяется исследованию ядерного генома коренных малых народов Восточной Сибири: рассматриваются не только генетическая история, а также адаптации представителей Сибирских популяций к холоду и богатому мясной пищей рациону [5], [10], [11]. В исследования показано генетическое сходство популяций Центральной и Южной Сибири, в то время как население Северо-Восточной Сибири содержит в своем генофонде уникальные генетические компоненты, которые отражают сигналы региональной селекции [12]. Популяции Северо-Восточной Сибири отделились от основной линии восточно азиатских популяций около 8.8–11.2 тысяч лет назад [13]. Таким образом, современный генетический портрет коренного населения Дальнего Востока сформировался под влиянием таких факторов как: индивидуальная этническая история каждого народа, взаимоотношение этносов между собой и их маршруты миграции. Благодаря относительно длительной генетической изоляции и сохранению традиционного образа жизни, образцы ДНК, полученные от представителей различных популяций Дальнего Востока, могут дополнить эволюционную историю данного региона. Уже опубликованы работы, рассматривающие митохондриальный геном ительменов, коряков, чукчей, эвенков, эскимосов, юкагиров, негидальцев, нивхов, ороков, удэгейцев, и ульчей [1-9 губина]. Однако по-прежнему стоит необходимость в получении большего количества образцов ДНК от представителей различных этнических групп Дальнего Востока, а также применение к ним разнообразных методов генетического анализа.

Нивхи одна из наиболее интересных и малоизученных популяций Дальнего Востока. Проживая на острове Сахалин и континенте (низовья реки Амур) нивхи оставались численно процветающей популяцией до начала колонизации Дальнего Востока русскими. По официальным данным на Сахалине в 1856 году проживало 3270 нивхов, через 15 лет 1500, а в 1889 году только 320. На численность коренного населения также повлияла и русско-японская война (1904-1905), поделившая остров на две части: южная часть острова принадлежала Японии, а северная – России. В результате чего, часть нивхов (около 100 человек) оказалась в Японии (груздева 1998). Оба государства активно проводили политику ассимиляции коренного населения, в результате доля коренных жителей, говорящих на родном языке заметно сократилось. Лингвисты выделяют 4 диалекта нивхского зыка: амурский, восточно-сахалинский, северно-сахалинский и южно-сахалинский, последний из которых использовался нивхами на территории Японии и в настоящий момент считается утраченным (груздева, 1998). Специалисты отмечают уникальность нивхского языка, по своей структуре не похожего ни на один язык соседских народов, что подтверждает длительное развитие этноса в изоляции.

Вопрос о происхождении Нивхов до сих пор остается открытым. К настоящему моменту доступно небольшое количество образцов митохондриальной ДНК и еще меньше данных о генотипировании нивхов [5]. Так, данные митохондриальной ДНК подтверждают гипотезу о длительной изоляции нивхов и близлежащих популяций (ульчей, негидальцы, удэгейцы) от населения континентальной Сибири [3] и отмечают генетическую связь между жителями нижнего Амура, Сахалина и Хоккайдо с момента их общего существования (Адачи 2009). Также, прослеживается родство популяции нивхов, айнов и различных японских популяций (континентальные японцы, окинавыцы) (Tajima 2004 Ainu)

**1.2. Однонуклеотидный полиморфизм (SNP)**

Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) - вариабельные однонуклеотидные позиции генома человека, в которых частота минорного аллеля составляет не менее 1% [14]. Для каждой позиции генома можно заффиксировать замену на любой из четырех возможных нуклеотидов, однако на практике би-аллельные встречаются чаще всего (менее 0.1% трех-аллельных полиморфизмов от всех SNP человека [15] Среди генетических вариаций, аллели встречающиеся у более чем 0,01% человечества индексируются и заносятся в базу данных (dbSNP NCBI USA). Геном человека содержит 3,2 миллиарда пар нуклеотидов, в котором на 1000 оснований приходится 1 SNP (Luger K, Mäder AW, Richmond RK et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution // Nature. 1997). Одиночные полиморфизм встречаются как в кодирующих, так и в некодирующих облостях генома и могут отвечать за определенные фенотипические признаки или представлять нейтральную вариацию, которая может быть использована при анализе полиморфизма в контексте эволюционных процессов [16]. Использование SNP, как наиболее многочисленных и стабильных маркеров [17], позволяет анализировать большое число аллелей в различных областях медицины [18] популяционной экологии [19] и эволюционной генетике [20]. Также повсеместное использование однонуклеотидных полиморфизмов обусловлено одновременным развитием технологий в смежных областях исследования (анализ генома и связанных с ним технологий, биоинформатика и вычислительная техника, популяционной генетика человека на глобальном уровне).

ДНК-микрочипы основанные на использовании SNP как молекулярно-генетические маркеров применяют для выявления генетических вариаций между представителями различных этносов [21]. Частота встречаемости определенного полиморфизма в конкретном генотипе зачастую отличается у представителей различных народов, что может указывать на медицинские особенности определенных этносов. Кроме того, доказано влияние однонуклеотидных полиморфизмов на устойчивость организма к внешним воздействиям среды [22].

Большинство готовых ДНК-микрочипов были разработаны для медицинских генетических экспериментов и не рассчитаны на глобальные популяционные исследования. Это послужило причиной для разработки ДНК-чипов для реконструкции эволюционной истории человечества [23], [axiom]. Получение все большего количества данных, основанных на генотипировании SNP различных этносов, позволяет выявить достоверную генетическую дифференциацию и отнести конкретных людей к определенным популяциям, а также помогает реконструировать маршруты распространения людей по земному шару.

Большинство исследований в области популяционной генетике человека были посвящены, главным образом, европейскому населению [24], [Ancient human genomes suggest three ancestral populations for present-day Europeans] в то время как малочисленные популяции по всему миру нуждаются в дополнительном генетическом анализе.

**1.3. Биоинформатический анализ геномных данных**

**1.3.1. Современные ДНК-микрочипы**

В последние 10 лет технологий высокопроизводительного секвенирования (NGS) стали мощными, гибкими и широко распространёнными методами в различных областях биологии и медицины. В эволюционной биологии благодаря NGS – технологиям стали возможными широкомасштабные геномные исследования на популяционном уровне[25]. Однако использование ДНК-микрочипов (DNA microarray) обходится дешевле и требует меньше вычислительных ресурсов по сравнению с NGS- секвенирования. Первоначально разработанные для определения уровня экспрессии генов, микрочипы являются удобным аналитическим инструментом для определения геномных особенностей человека [26]. ДНК-микрочип содержит на своей поверхности зонды – специфические олигонуклеотиды или протяженные фрагменты ДНК/РНК, способные гибридизоваться с кодирующей ДНК или матричной РНК по принципу комплементарного связывания нуклеотидов. Для подтверждения связывания гибридизации ДНК-чип сканируется до тех пор, пока не будет получен весь паттерн гибридизации. На площади чипа в несколько квадратных сантиметров помещаются десятки тысяч элементов, что позволяет сконструировать матрицы для эффективного проведения индивидуальных исследований. Сейчас подобные технологии являются бурно развивающимся направлением - биологические фирмы предлагают микрочипы, содержащие до нескольких сотен тысяч зондов [ссылка на illlumina, affymetrix].

На сегодняшний день в исследованиях широко распространены 2 типа ДНК-чипов в зависимости от природы зондов. В первом случае ДНК-зонды, синтезируются непосредственно на поверхности чипа (*in situ*). Второй тип объединяет в себе независимо синтезированные зонды, которые наносят на поверхность чипов. По технологии изготовления ДНК-чипы можно разделить на: печатные (printed), фотолитографические (in situ synthesized) и высокоплотного кварцевого нанесения (high-density bead arrays) (Кулемин).

Первыми и наиболее известными ДНК-чипами высокой плотности (high-density microarrays), изготовленные по *in situ* технологии, являются чипы фирмы Affymetrix (ссылка в вк последняя). Технология Affymetrix GeneChip разработана в 1990-х годах командой Стива Фодора, основанная на комбинации фотолитографии и методов комбинаторной химии [27]. Данная технология обеспечивает высокую плотность размещения зондов на поверхности кварцевого стекла при анализе точечных мутаций, однонуклеотидных полиморфизмов и анализе экспресси генов. [Dalma-Weiszhausz DD, Warrington J, Tanimoto EY, Miyada CG. The affymetrix GeneChip platform: an overview. Methods Enzymo].

Технологическая платформа Illumina представляет чипы высокоплотного кварцевого нанесения (технология BeadChips). На поверхности чипа располагаются кремниевых бусины с закрепленными олигонуклеотидными зондами. Каждая бусина кроме специфического набора олигонуклеотидов имеет также и кодирующий элемент, для ее однозначного идентификации.

При работе с микрочипами используется технология APEX (arrayed primer extension) [Tebbutt SJ. Genotyping of single nucleotide polymorphisms by arrayed primer extension. Methods Mol Biol., Pullat J, Metspalu A. Arrayed primer extension reaction for genotyping on oligonucleotide microarray.]. Данный подход комбинирует метод полимеразной реакции и гибридизации. Олигонуклеотид, закрепленный на чипе, комплементарен целевой молекулы и меньшее нее ровно на один нуклеотид (SNP). При добавлении к гибридизованным комплексам (кодирующая ДНК- олигонуклеотид) ДНК-полимеразы и меченых ддНТФ происходит присоединение к олигонуклеотиду-приймеру меченого дидезоксинуклеотидтрифосфата, который комплементарен нуклеотиду в кодирующей ДНК. Нуклеотид, вступивший в реакцию определяется по цвету флуорисцентной метки, тем самым определяя SNP в данном сайте. Далее, чип сканируется на яркость и цвет свечения для определения статуса полиморфизма.

Проект HapMap [28], основываясь на распределении блоков неравновесия по сцеплению, позволил отобрать максимально информативные полиморфные маркеры генома человека, доказав, что генотипирование каждого SNP – избыточно. Основным критерием при выборе коммерческого чипа является общее покрытие (global coverage) генома. Тем не менее данная характеристика не обеспечивает одинаковую плотность покрытия на протяжении всего генома и общее количество маркеров не может выступать единственным критерием при выборе ДНК-чипа [17].

Выбор ДНК-микрочипа обусловлен поставленной перед исследователем задачей, количеством образцов и техническими характеристиками самого чипа. Первостепенная сложность при наличии данных о генотипировании образцов с различных ДНК-чипов – нахождение чипов с большим количеством пересечений по SNP и дальнейший биоинформатический анализ, направленный на объединение образцов в одну выборку. В настоящем исследовании для генотипирования использовались чипы Infinium OmniExpress-24 BeadChip компании Illumina исходя из………..

В таблице 1 приведена краткая информация о наиболее часто используемых ДНК-биочипах в области популяционной генетике человека [29],[5],[10],[30].

|  |  |
| --- | --- |
| Название биочипа | Особенности |
| Infinium OmniExpress-24 BeadChip | * Технология сканирования: HiScan, [iScan](https://emea.illumina.com/content/illumina-marketing/emea/en_GB/systems/array-scanners/iscan.html) * Количество маркеров: фиксировано – 713,599 шт., дополнительно – 30000 шт. * Особенности: олигонуклеотиды на чипе подобраны таким образом, чтобы охватить наибольшее количество распространенных ОНП. |
| Infinium OmniExpress-12 BeadChip | * Технология сканирования: HiScan, [iScan](https://emea.illumina.com/content/illumina-marketing/emea/en_GB/systems/array-scanners/iscan.html) * Количество маркеров: фиксировано – 730,525 шт., дополнительно – 200000 шт. * Особенности: возможность включения большого числа специфических маркеров при генотипировании |
| Human660W-Quad BeadChip | * Технология сканирования: HiScan, [iScan](https://emea.illumina.com/content/illumina-marketing/emea/en_GB/systems/array-scanners/iscan.html) * Количество маркеров: фиксировано –657366 шт. * Особенности: обеспечивает высокое покрытие широко распространенных SNP |
| Human1M-Duo BeadChip | * Технология сканирования: HiScan, [iScan](https://emea.illumina.com/content/illumina-marketing/emea/en_GB/systems/array-scanners/iscan.html) * Количество маркеров: фиксировано –1140419 шт., * Особенности: обеспечивает высокое покрытие вдоль всего генома |
| Genome-Wide Human SNP Array 6.0 | * Технология сканирования: GeneChip®Scanner 3000 7G * Количество маркеров: фиксировано – 934946 шт., * Особенности: выокая специфичность связывания молекул, высокая плотность покрытия, наличие 946000 маркеров для анализа копийности генов. |

По мере того, как стоимость секвенированию и генотипированию продолжает падать, объем генерируемых данных увеличивается, все большее значение приобретает правильный подход к хранению и обработке данных [31].

**1.3.2. Методы анализа ядерной ДНК**

**1.3.2.1. Метод главных компонент** (**PCA)**

Метод главных компонент (Рrincipal component analysis (PCA)) – широко распространенный метод в популяционной генетике для визуализации данных, позволяющий уменьшить их размерность, потеряв наименьший объем информации. Вместо начального количества исходных признаков вычисляется такое же количество новых признаков – главных компонент. Первая главная компонента скоррелирована с исходными данными. Следующая компонента характеризует вторую по значимости долю изменчивости и при этом не имеет корреляции с первой компонентой. Данный метод может быть использован при анализе нескольких сотен исходных признаков, который сводится к рассмотрению первых двух-трех главных компонент. Подробные детали методы описаны в статье [32].

**1.3.2.2. Метод предковых компонент (Admixture)**

Анализ, демонстрирующий смешанность состава популяции на основе данных генотипа. Используя данные о известных генотипах и количестве предполагаемых предковых популяций, программа строит свою модель того, какой вклад внес каждый предполагаемы предок в уже известные популяции. Чем больше вклад каждой предполагаемой предковой популяции в индивида, тем больше общего количество SNP имеет индивид с представителями предполагаемого предка.

**1.3.2.3. Анализ неравновесного сцепления генов (ALDER)**

ALDER (Admixture-induced Linkage Disequilibrium for. Evolutionary Relationships) в своем анализе популяционной истории использует оценку двух параметров: рекомбинации и неравновесия по сцеплению. Рекомбинация – процесс обмена генетическим материалом между разными молекулами ДНК. Неравновесие по сцеплению – явление передачи нескольких участков ДНК одним блоком, которые формируются неодинаково в разных популяциях из-за наследования разных комбинаций сегментов ДНК. Основа метода заключается в выявлении специфических блоков участков ДНК для каждой популяции и на оценке доли общих сегментов в определенной выборке популяций. ALDER определяет возможность того, что две выбранные группы являются предковыми по отношению к тестируемым популяциям. Метод позволяет отследить время смешения, анализируя доли рекомбинации на одно поколение. Стоит отметить, что ALDER-статистика имеет смысл только при достаточном количестве образцов (n > 20) и при анализе событий, имевших место меняя 5500 лет назад [33] Pickrell et al., 2014].

**1.3.2.4. Трёхпопуляционный тест**

Трёхпопуляционный тест позволяет определить характер взаимоотношений между интересующими популяциями. F3 статистику можно определить, как произведение разниц частот аллелей между тремя популяциями (C, A и В) и представить в виде формулы: F3(C; A, B) = Σ(c' – a')(c' - b'). Результат F3 статистики будет положительным, если популяция С является отдельной ветвью по отношению к двум другим популяциям и генетический поток между ними не наблюдается. Если популяция С возникла в результате смешения А и В, то значение F3 статистики – отрицательно. Степень достоверности полученных результатов определяется Z-критерием (число среднеквадратичных отклонений, отделяющее значение F3-статистики от нуля). Значения F3 статистики, для которых |Z| >3 определяются как достоверные.

**2. Материалы и методы**

**2.1. Состав выборки**

Сотрудниками лаборатории молекулярной генетики человека в рамках экспедиционных выездов, выполненных в ,,,,,, 2016 (о. Сахалин, пос. Ноглики, пос. Вал), 2017 (Республика Тыва,), …….. было собрано 48 образцов крови среди челканцев, кумандинцев, нивхов, тоджинцев и телеутов. В качестве потенциальных доноров отбирали неродственных людей старшего возраста. Генотипированию подвергли пробы от 7 челканцев, 9 кумандинцев, 14 нивхов, 1 орока, 7 тоджинцев и 9 телеутов.

Общая выборка для анализа ядерного генома составила ,,,, человек из различных этносов (таблица 2): 48 образцов генотипировано впервые и ,,,, опубликовано ранее [5], [10].

|  |  |
| --- | --- |
| Происхождение | Количество образцов |
| Altai-Kizhi |  |
| Buryat |  |
| Chelkan |  |
| Chukchi |  |
| Dolgan |  |
| Eskimo |  |
| Even |  |
| Evenk |  |
| Hakas |  |
| Ket |  |
| Koryak |  |
| Kumandin |  |
| Nivkh |  |
| Orok |  |
| Shor |  |
| Teleut |  |
| Todzhu |  |
| Vietnamese |  |
| Yakut |  |