



**Slika 6.** Pre oko 40.000 godina i kasnije, neandertalci su bili dominirajući ljudi u zapadnoj Euroaziji, šireći se na kraju istočno čak do Altajskih planina. Oni su preživeli početni priliv savremenih ljudi pre najmanje 120.000 godina. Potom, pre 60.000 godina i kasnije, savremeni ljudi drugi put su prodrli iz Afrike u Euroaziju. Nedugo potom, neandertalci su izumrli.

bar dve prilike za susrete neandertalaca i savremenih ljudi: kada su rani savremeni ljudi najpre naselili tu oblast pre oko 100 hiljada godina i formirali populaciju koja se susrela sa neandertalcima koji su se širili, i kad se savremeni čovek vratio i tu zamenio neandertalce pre oko 60 ili 50 hiljada godina.

## NEANDERTALSKA DNK

Da li su se te dve populacije ukrštale? Da li su neandertalci među direktnim precima bilo kojih savremenih ljudi? Postoje neki skeletni dokazi hibridizacije. Erik Trinkhaus identifikovao je ostatke kao što su oni iz pećine Oase u Rumuniji, za koje tvrdi da su između savremenih ljudi i neandertalaca. Međutim, zajedničke skeletne osobine ponekad odražavaju adaptaciju na iste pritiske sredine, a ne zajedničkog porekla. Zato arheološki i skeletni nalazi ne mogu da odrede srodnost neandertalaca sa nama. Proučavanje genoma može.

U početku su se naučnici koji su proučavali DNK usredsređivali isključivo na mitohondrijsku DNK iz dva razloga. Prvi, u svakoj ćeliji ima oko hiljadu kopija mitohondrijske DNK u poređenju sa dve kopije najvećeg dela preostalog genoma, što povećava mogućnost uspešnog izdavanja. Drugi, mitohondrijska DNK je puna informacija: postoji mnogo više razlika za dati broj slova DNK nego na većini drugih mesta u genomu, što omogućava da se postignu znatno preciznija merenja vremena genetskog razdvajanja za svako slovo DNK koje se sa uspehom pročita. Analiza mitohondrijskih podataka potvrdila je da su neandertalci imali zajedničkog pretka po majčinskoj liniji sa savremenim ljudima skorije nego što se ranije mislilo - najbolja trenutna procena je pre 470 do 360 hiljada godina. Analiza mitohondrijske DNK takođe je potvrdila da su neandertalci bili veoma posebni. Tip njihove DNK bio je izvan opsega današnjih varijacija kod ljudi, i imao je zajedničkog pretka sa nama u vreme koje je višestruko starije od vremena kada je živela *Mitohondrijska Eva*.

Mitohondrijska DNK neandertalca nije dala nikakvu osnovu za teoriju da su se neandertalci i savremeni ljudi mešali kad su se susreli, ali u isto vreme podaci iz mitohondrijske DNK nisu mogli da isključe do oko 25 odsto doprinosa neandertalca DNK savremenog neafrikanca. Postoji razlog zašto imamo tako malo mogućnosti da donosimo zaključke o doprinosu neandertalaca savremenim ljudima zasnovane samo na mitohondrijskoj DNK. Čak i ako savremeni ljudi izvan Afrike danas imaju značajno neandertalsko poreklo, postoji samo jedna ili nekoliko žena koje su živjele u to vreme i koje su bile dovoljno srećne da proslede svoju mitohondrijsku DNK savremenim ljudima, i ako je većina tih žena pripadala savremenim ljudima, obrasci koje vidimo danas ne bi iznenađivali. Tako mitohondrijski podaci nisu mogli dati ube-

dljiv odgovor, ali, uprkos tome, shvatanje da se neandertalci i savremeni ljudi nisu mešali ostalo je naučna ortodoksija sve dok tim Svante Paba nije izdvojio DNK iz celokupnog genoma neandertalca, čime je omogućio da se istraži istorija svih predaka, a ne isključivo po majčinskoj liniji.

Napredak u sekvenciranju celokupnog genoma neandertalca omogućen je ogromnim skokom efikasnosti tehnologije za izučavanje drevne DNK tokom decenije nakon sekvenciranja mitohondrijske DNK neandertalca.

Glavni oslonac istraživanju drevne DNK pre 2010. bila je tehnika koja se naziva polimerazna lančana reakcija (PCR). Ovo je uključivalo izbor delova DNK koji će biti cilj i zatim sintetizovanje fragmenata DNK približne dužine dvadeset slova koji se podudaraju sa genomom sa svake strane ciljanog segmenta. Ovi jedinstveni fragmenti izabiru ciljani deo genoma, koji se onda udvostručuju više puta pomoću enzima. Efekat je taj da se delić celokupnog DNK uzorka pretvori u veliku sekvencu. Ovaj metod odbacuje najveći deo DNK (deo koji nije ciljan). Uprkos tome, on može da izdvoji bar nešto DNK koji je od interesa. Novi pristup izdavanju drevne DNK bio je radikalno drugačiji.

Zasnivao se na sekvenciranju celokupne DNK u uzorku, nezavisno od dela genoma iz kojeg potiče, i bez prethodnog odabiranja DNK baziranog na ciljanim sekvencama. Koristio je sirovu snagu novih mašina, koje su od 2006. do 2010. smanjile cenu sekvenciranja najmanje za oko deset hiljada puta. Računari su mogli da obrađuju podatke kako bi se sastavio najveći deo genoma ili alternativno da se izabere gen od interesa.

Da bi novi pristup delovao, Pabovom timu je trebalo da prevaziđe više izazova. Prvo, trebalo je da nađu kost iz koje su mogli da izdvoje dovoljno DNK. Antropolozi često rade sa fosilima - kostima koje su potpuno mineralizovane i okamenjene. Ali nije moguće dobiti ni najmanju količinu DNK iz pravog fosila. Pabo je zbog toga tražio kosti koje nisu potpuno mineralizovane, a sadržavale su organski materijal, uključujući i delove dobro sačuvane DNK. Drugo, pretpostavljajući da je tim mogao da nađe *zlatni uzorak* sa dobro sačuvanom DNK, još uvek su morali da prevaziđu problem zagađenja uzorka mikropskom DNK, koja dolazi od bakterija i gljivica koje se ugrađuju u kosti nakon smrti pojedinca. Oni doprinose najvećem delu DNK u većini drevnih uzoraka. I na kraju, tim je morao da uzme u obzir verovatnoću zagađenja od strane istraživača - arheologa ili molekularnih biologa - koji su rukovali uzorcima i hemikalijama i možda na njima ostavili tragove svoje DNK.

Zagađenje je ogromna opasnost u izučavanju DNK drevnih ljudi. Zagađene sekvence mogu da odvedu analitičare na pogrešan put zbog toga što su savremeni ljudi koji rukuju kostima u rodstvu, čak iako veoma dalekom, sa in-

dividuumu koju sekvenciraju. Tipičan delić DNK drevnog neandertalca iz dobro očuvanog uzorka je dug samo oko četrdeset slova, dok je učestalost razlika između savremenih ljudi i neandertalaca oko jedan na šesto slova, tako da je nekada nemoguće reći da li konkretni deo DNK dolazi iz kosti ili od nekoga ko je njome rukovao. Zagađenje je svaki put izlučivalo istraživače DNK. Na primer, Pabova grupa je 2006. sekvencirala oko milion slova DNK neandertalaca kao probu pre sekvenciranja celokupnog genoma. Visok udeo sekvenci dolazio je od zagađenja od strane savremenih ljudi, što je ugrožavalo tumačenje podataka.

## INOVATORI NA PODRUČJU PROUČAVANJA MEŠANJA STANOVNIŠTVA

Savremene mere za minimizovanje mogućnosti zagađenja u analizi drevne DNK, koje su već bile počele da se primenjuju u proučavanju iz 2006. i koje su se kasnije još više razvile, uključivale su opsesivan skup mera opreza. Za studiju iz 2010, u kojoj su Pabo i njegov tim uspešno sekvencirali nezagađeni neandertalski genom, svaku kost koju su ispitivali odneli su u *čistu sobu*, koju su prilagodili prema projektima za čiste prostorije koje se koriste u računarskoj industriji za proizvodnju mikročipova. Iznad glave se nalazilo ultraljubičasto (UV) svetlo istog tipa kao ono koje se upotrebljava u hirurgijskim salama, i uključivano je svaki put kad su istraživači bili odsutni da bi se zagađena DNK pretvorila u oblik koji ne može da bude sekvenciran (svetlo uništava i drevnu DNK na spoljašnjosti uzorka, ali istraživači buše ispod površine i tako mogu da pristupe onoj DNK koja nije uništena). Vazduh je ultrafiltriran da bi se odstranile sićušne čestice prašine - sve što je veće od hiljadu puta umanjene ljudske vlasi - što bi moglo da zagađi DNK. U prostoriji je povećan pritisak tako da je vazduh strujao od iznutra ka spolja da bi se uzorci zaštitili od bilo koje zagađujuće DNK koja bi iz spoljašnjosti dolebdela u laboratoriju.

U kompleksu su postojale tri odvojene prostorije. U prvoj, istraživači su oblačili čista odela koja su pokrivala celo telo, navlačili rukavice i maske za lice. U drugoj, stavljali su u komoru kosti odabrane za uzorkovanje, gde su bile izložene UV zračenju visoke energije, ponovo sa ciljem da pretvore zagađenu DNK koja je možda bila na površini u oblik koji se ne može sekvencirati. Istraživači su zatim vadili unutrašnjost kostiju koristeći sterilisanu zubnu bušilicu, skupljali desetine ili stotine miligrama praha na aluminijsku foliju ozračenu UV zracima i taj prah smeštali u cev takođe ozračenu UV zracima. U trećoj komori sipali su prah u hemijski rastvor koji je odvajao minerale kosti i proteine, i sipali rastvor preko čistog peska (silicijum dioksid), koji pod odgovarajućim uslovima vezuje DNK, a odvaja sastojke koji zagađuju hemijsku reakciju korišćenu za sekvenciranje.

Istraživači su zatim pretvorili dobijene deliče DNK u oblik koji je mogao da se sekvencira. Prvo, oni su hemijski odstranili iskrzane krajeve deliča DNK degradirane nakon desetina hiljada godina provedenih pod zemljom. Posebnom merom za odstranjivanje zagađenja iznad onog koje je bilo upotrebljeno u studiji iz 2006, Pabo i njegov tim prikazali su veštački sintetizovanu sekvencu slova, hemijski *barkod*, na krajeve deliča DNK. Bilo koja zagađena sekvencu koja je ušla u eksperiment nakon kačenja barkoda mogla je time da se razlikuje od DNK drevnog uzorka. Završni korak bio je da se zakače molekularni adapteri na svaki kraj, što je omogućilo da deliči DNK budu sekvencirani u jednoj od novih mašina koje su učinile sekvenciranje desetina hiljada puta jeftinijim od prethodne tehnologije.

Ispostavilo se da su tri najbolje očuvana uzorka neandertalca približno 40 hiljada godina stare kosti ruke i noge iz pećine Vindija u brdima Hrvatske. Nakon sekvenciranja iz ovih kostiju, Pabov tim je našao da velika većina deliča DNK koje su dobili potiče od bakterija i gljivica koje su naselile kosti. Ali, poredeći milione fragmenata sekvenci genoma današnjeg čoveka i šimpanze, našli su zlato među otpacima. Ovi referentni genomi bili su kao slagalica, i dali su ključ da se poređaju sitni deliči DNK koje su oni sekvencirali. Te kosti su sadržavale čak 4 odsto DNK drevnog čoveka.

Kad je Pabo 2007. shvatio da će moći da sekvencira ceo genom neandertalca, okupio je međunarodni tim stručnjaka sa ciljem da se obezbedi da analiza bude isto tako dobra kao podaci. Tako sam i ja uključen, zajedno sa svojim glavnim naučnim saradnikom, primenjenim matematičarem Nikom Patersonom. Pabo nas je pozvao zato što smo se prethodnih pet godina dokazali kao inovatori na području proučavanja mešanja stanovništva. Tokom mnogih putovanja u Nemačku, imao sam važnu ulogu u analizama koje su dokazale ukrštanje neandertalaca i nekih savremenih ljudi. ■