



**СКРЕЩИВАЛИСЬ ЛИ НЕАНДЕРТАЛЬЦЫ МАССОВО С КРОМАНЬОНЦАМИ?
(С ПАЛЕОДИЛЕТАНТСКОЙ ТОЧКИ ЗРЕНИЯ, НО С УЧЕТОМ ДАННЫХ ПОЛНОГЕНОМНОГО
СЕКВЕНИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ СОВРЕМЕННОЙ И ДРЕВНЕЙ ДНК, А ТАКЖЕ НА ОСНОВЕ ЗНАНИЙ
ИСПОЛЪЗУЕМЫХ ДЛЯ ЭТОГО ТЕХНОЛОГИЙ)**

¹Чемерис А.В., ¹Гарафутдинов Р.Р., ¹Сахабутдинова А.Р., ²Морозов Р.А., ¹Матниязов Р.Т.,
¹Геращенко Г.А., ¹Кулуев Б.Р., ¹Баймиев Ан.Х., ¹Баймиев Ал. Х., ³Чемерис Д.А.

¹Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, проспект Октября, 71. Email: chemeris@anrb.ru

²Национальный исследовательский университет «МИЭТ», Россия, 124498, Москва-Зеленоград, пл. Шокина, 1

³ООО «Максим Медикал», Россия, 123423, Москва, ул. Народного Ополчения, д. 34, стр. 1

Резюме

До прихода около 50 тысяч лет назад на территорию нынешней Западной Европы людей современного анатомического типа, называемых также кроманьонцами, на ней до этого в течение приблизительно 300 тысяч лет жили неандертальцы, которые вскоре исчезли. Причина вымирания неандертальцев занимает умы многих поколений палеоантропологов, причем за эти годы выдвинуто большое количество разнообразных версий, по одной из которых произошла ассимиляция неандертальцев кроманьонцами, что на самом деле не соответствует действительности. На вопрос, происходило ли межвидовое скрещивание этих древних гоминин, уверенно можно сказать лишь одно – неандертальцы свой вклад в популяции современных людей не внесли, что видно из различий в нуклеотидных последовательностях ДНК наследуемых матрично митохондриальных геномов. Обнаруженное с помощью полногеномного секвенирования ядерной ДНК присутствие некоторых аллельных вариантов (в виде ряда однонуклеотидных замен) отдельных генов неандертальцев в геномах современных людей все же требует дополнительной проверки, для чего необходимо секвенирование большего числа полных геномов древних гоминин с большим покрытием. При этом и выборки современных геномов для такого анализа должны быть основательно увеличены, поскольку только сейчас на Планете «проживает» около 8 миллиардов весьма разных уникальных «геномов», и не менее 100 миллионов неандертальцев жило за весь период их существования, также несших уникальные геномы, хотя их полиморфизм был несколько ниже. В статье акцентировано внимание на том, что полным геномом (человека) должен считаться лишь его диплоидный вариант, который можно обозначить как 6.0, тогда как все ныне секвенированные геномы древних людей являются по сути квазигиплоидными и могут быть обозначены как 3.0, исходя из количества миллиардов пар нуклеотидов как в двойном, так и в одинарном наборе хромосом, соответственно. Соответственно, и покрытие при секвенировании геномов должно пересчитываться на их диплоидный статус, и не только для древних организмов. Также отмечается, что для секвенирования древней ДНК настоятельно требуется разработка новых мономолекулярных методов секвенирования, пусть и характеризующихся меньшей производительностью (скоростью), но не зависящих от каких-либо дополнительных манипуляций (амплификации, любых иных ферментативных обработок), что позволит устанавливать последовательность нуклеотидов как она есть, включая распознавание урацилов и модификаций азотистых оснований, а также их отсутствие в ДНК, что, безусловно, повысит точность данного процесса.

Ключевые слова: неандерталец, кроманьонец, анатомически современный человек, *Homo sapiens*, *Homo neanderthalensis*, палеогеномика, палеоантропология, полногеномное секвенирование, T2T секвенирование, квазигиплоидный геном, диплоидный геном, пангеном, древняя ДНК, скрещивание

Цитирование: Чемерис А.В., Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Морозов Р.А., Матниязов Р.Т., Герашенков Г.А., Кулуев Б.Р., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал. Х., Чемерис Д.А. Скрещивались ли неандертальцы массово с кроманьонцами? (*С палеодилетантской точки зрения, но с учетом данных полногеномного секвенирования образцов современной и древней ДНК, а также на основе знаний используемых для этого технологий*) // *Biotics*. 2022. Т.14(2). С.156-179. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-12

© Авторы

**DID NEANDERTHALS INTERBREED EN MASSE WITH CRO-MAGNONS?
(FROM A PALEODILETTANTISH POINT OF VIEW BUT TAKING INTO ACCOUNT THE DATA OF
WHOLE GENOME SEQUENCING OF MODERN AND ANCIENT DNA SPECIMENS AS WELL
AS KNOWLEDGE OF THE TECHNOLOGIES USED FOR THIS)**

¹Chemeris A.V., ¹Garafutdinov R.R., ¹Sakhabutdinova A.R., ²Morozov R.A., ¹Matniyazov R.T.,
¹Gerashchenkov G.A., ¹Kuluev B.R., ¹Baymiev An.Kh., ¹Baymiev Al.Kh., ³Chemeris D.A.

¹Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences,
71 Pr. Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia. Email: chemeris@anrb.ru

²National Research University of Electronic Technology, 1 Shokin Square, Moscow-Zelenograd, 124498, Russia

³Maxim Medical LLC, 34-1 Narodnogo Opolcheniya str., Moscow, 123423, Russia

Resume

Neanderthals lived on the territory of present-day Western Europe for about 300 thousand years before the arrival of people of modern anatomical type, also called Cro-Magnons, about 50 thousand years ago. After that Neanderthal soon disappeared and what happened to them occupies the minds of many generations of paleoanthropologists, and over the years a large number of different versions have been put forward, according to one of which there was assimilation of Neanderthals by Cro-Magnons, which in fact does not correspond to reality. To the question whether interbreeding of these ancient hominins took place, one can confidently say only one thing – Neanderthal women did not contribute to the populations of modern humans, as can be seen from the differences in the nucleotide DNA sequences of inherited matrilineal mitochondrial genomes in Neanderthals and modern humans. The presence of some allelic variants of individual Neanderthal genes in the form of a number of single-nucleotide substitutions in the genomes of modern humans, detected by full-genome sequencing of nuclear DNA is still necessary an additional verification, which requires sequencing a larger number of complete genomes of ancient hominins with a large coverage. At the same time, the samples of modern genomes for such an analysis should be thoroughly increased, since only now about 8 billion very different modern unique "genomes" "live" on the Planet, and at least 100 million Neanderthals lived for all the years, also carrying unique genomes, although their polymorphism was somewhat lower. The article focuses on the fact that only diploid variant of genome, which can be designated as 6.0, should be considered a complete genome for human, whereas all currently sequenced genomes of ancient people are essentially quasi-haploid and can be designated as 3.0, based on the numbers of billions of pairs of nitrogenous bases in both double and single a set of chromosomes, respectively. Accordingly, the coverage during genome sequencing should be recalculated for their diploid status but not only for ancient organisms. It is also noted that the sequencing of ancient DNA urgently requires the development of new monomolecular sequencing methods, albeit characterized by lower productivity (speed), but independent of any stage of amplification and any enzymatic treatments, which will allow to establish the sequence of nucleotides as it is, including the recognition of uracils and other modifications of nitrogenous bases, as well as the absence of these in the DNA chains, which will certainly increase the accuracy of this process.

Keywords: Neanderthal, Cro-Magnon, anatomically modern man, *Homo sapiens*, *Homo neanderthalensis*, paleogenomics, paleoanthropology, whole genome sequencing, T2T sequencing, quasi-haploid genome, diploid genome, pangenome, ancient DNA, interbreeding

Citation: Chemeris A.V., Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Morozov R.A., Matniyazov R.T., Gerashchenkov G.A., Kuluev B.R., Baymiev An.Kh., Baymiev Al.Kh., Chemeris D.A. Did Neanderthals interbreed *en masse* with Cro-Magnons? (*From a paleodilettantish point of view but taking into account the data of whole genome sequencing of modern and ancient DNA specimens as well as knowledge of the technologies used for this*). *Biomics*. 2022. V.14(1). P. 156-179. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-12 (In Russian)

© Authors

Введение

К рассмотрению вопроса скрещивания неандертальцев *en masse* с кроманьонцами, называемыми сейчас чаще анатомически современными людьми, подойдем издалека, а точнее с позиций дня сегодняшнего или даже завтрашнего, отстоящих от тех событий приблизительно на 40 тысяч лет. При этом неандертальцы делили общую территорию с кроманьонцами на протяжении 2 - 5 тысяч лет (по другим данным – от 1 до 10 тысяч лет) в зависимости от географического местоположения. Причем репродуктивного барьера у этих видов, скорее всего, не было, поскольку за 800 тысяч лет до этого (или даже меньше) они имели общего предка и не успели разойтись в эволюции настолько далеко, чтобы их потомство было неплодовитым. Но здесь дело скорее даже не во времени их расхождения, а в кариотипе этих видов, поскольку у человека – 46 хромосом, тогда как у нашего ближайшего ныне живущего сородича – шимпанзе – 48 хромосом, две из которых объединились в одну. Когда произошло это объединение и сколько хромосом было у неандертальцев – это еще более важный вопрос, на который, впрочем, смогло ответить только полногеномное секвенирование: их у них было также скорее всего 46. Однако чтобы ответить на вопрос – было ли вообще подобное скрещивание? – необходимо прибегнуть к современным данным в области секвенирования полных геномов как ныне живущих, так и архаичных людей. При этом требуется коротко коснуться используемых для этого технологий, которые нужно продолжать совершенствовать, в том числе специально разрабатывать для секвенирования древней ДНК.

Скрещивание неандертальцев и кроманьонцев

Переходя непосредственно к вопросу о скрещивании между собой неандертальцев и кроманьонцев, пожалуй, стоит произвести модную сейчас реконструкцию тех возможных доисторических событий, но только чисто умозрительно. С учетом того, что неандертальцы и кроманьонцы конкурировали фактически за одни и те же необходимые им для пропитания ресурсы и территории, то эти встречи могли носить далеко не дружественный характер, хотя первые (поскольку

кроманьонцы были явно более удачливыми охотниками) могли вообще стараться их избегать, как это происходит в животном мире, когда мелкие хищники не заходят на территорию, контролируемую более крупным хищником. Нельзя также исключать, что при таких встречах они не вступали в противоборство и просто уходили прочь восвояси, тем более, если провизии у них в тот момент было в достатке. Но при этом оба вида древних людей умели охотиться и явно имели навыки как нападения, так и обороны. Несмотря на то, что неандертальцы были, скорее всего, физически сильнее, кроманьонцы, по-видимому, обладая лучшим «вооружением» и, с высокой долей вероятности, некой членораздельной речью¹, могли более продуманно и организованно атаковать противника и побеждать его. Хотя в таких стычках, безусловно, могли играть важную роль как внезапность нападения, так и численность противоборствующих сторон, но при этом известно, что общины кроманьонцев были заметно крупнее, насчитывая до 100 и более особей против 20-25 у неандертальцев.

Однако нужно проводить такую доисторическую реконструкцию до конца и важно понять - что же происходило после победы той или иной стороны. Участвовала в таких стычках, надо думать, преимущественно мужская часть племени, а женскую часть затем ждала другая участь. Последующая история человечества такие примеры знает и, скорее всего, будет неправильным считать, что древние люди поступали по-другому. Вряд ли скрещивания неандертальцев и кроманьонцев, по крайней мере, относительно массово, происходили не после такой «битвы», а как-то иначе. С учетом того, что кроманьонцев становилось все больше, а неандертальцев все меньше, еще и, принимая во внимание более высокий интеллект первых, то, «победы» в таких «сражениях», по-видимому, чаще оказывались на стороне кроманьонцев. Тем самым снижая вероятность совоплощения мужчин-неандертальцев с женщинами-кроманьонками. Таким образом «поток генов» скорее всего, шел преимущественно от кроманьонцев к неандертальцам,

¹ Что нами довольно подробно рассмотрено в другой статье [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2022]

а не наоборот. Почему на этом заостряем здесь внимание? По очень простой причине. Так, сейчас с помощью анализа полных геномов современных и древних людей было показано, что некоторая часть генома неандертальцев в виде типичных для них аллельных вариантов ряда генов присутствует в ныне живущих людях. Причем стоит обратить внимание, что в отдельных публикациях, транслирующих первоначальную (правильную в смысле преподнесения) информацию, сейчас можно встретить упоминание, что от 1 до 4% ГЕНОВ неандертальцев обнаруживается в геномах современных людей. Абсолютно неверно. Непогруженный в тонкости наследования ДНК читатель может вообразить, что этих генов у *H. sapiens* просто не было, и они достались ему от *H. neanderthalensis*,² тогда как на самом деле речь идет всего лишь об аллельных вариантах тех же самых генов. Но к этому вопросу мы вернемся дальше.

Однако нельзя также исключать, что женские половины племен, занимаясь собирательством плодов разных растений, отдалялись от мест стоянок, где на них могли нападать мужчины другого вида человека при условии перекрытия ареалов их обитания и совершать акты насилия. Вряд ли стоит предполагать принятия в «свои ряды» представителей другого вида древних людей, хотя совсем исключать последнее, впрочем, нельзя. И при таких встречах поток генов действительно мог идти от неандертальцев к кроманьонкам³. Но насколько он мог носить массовый характер, учитывая к тому же, что не каждое совокупление приводит к беременности? Да и материнская вместе с младенческой смертностью были крайне высоки, в том числе и у кроманьонцев. Учитывая все эти обстоятельства, как оценить, сколько же таких межвидовых гибридных детей доживало до половозрелого возраста и оставляло потомство?! Видимо, крайне мало. К тому же, исходя из анализа нуклеотидных последовательностей отдельных генов, сейчас считается, что у таких гибридов могла быть сниженная фертильность. И это дополнительно снижало вероятность передачи неандертальских аллелей следующим потомкам, среди которых детская смертность была также высокой. Тем не менее, с помощью полногеномного секвенирования ДНК неандертальские аллельные варианты некоторых генов у современных людей были найдены. Но прежде чем более основательно коснуться этого вопроса, следует уделить определенное внимание полногеномному секвенированию, поскольку оно бывает очень разным.

² хотя теоретически и такое может быть

³ обратный поток исключать в этих случаях нельзя конечно же

Вариации готовности секвенированных полных геномов высших организмов для современных образцов

В нашей недавней статье [Баймиев и др. (Baumiev et al.), 2022] мы довольно подробно рассмотрели различные стадии завершенности проектов по полногеномному секвенированию современных образцов ДНК. Хотя они касались больше растений, тем не менее, общие принципы секвенирования полных геномов любых высших организмов практически одинаковы⁴, и поэтому здесь затронем эти вопросы максимально коротко, сделав акцент на других моментах.

Итак, в результате высокопроизводительного секвенирования ДНК новых поколений образуется большое количество сырых данных в виде прочтений разной длины в зависимости от используемой платформы и технологии. При этом такие фрагменты подчиняются распределению Пуассона и случайным образом разбросаны по геному. Поэтому однократного покрытия генома для восстановления его полной последовательности явно недостаточно и по теории вероятности при использовании некоего стандартного метода секвенирования ДНК считается, что 30-ти кратного покрытия для человеческого генома хватает даже с некоторым запасом, если считать, что геном имеет размер около 3 млрд.п.н. Но это лишь половинный размер генома человека, заключенный в 23 хромосомах, тогда как у человека 46 хромосом, и его истинно полный геном, с которым он живет и проявляются все его жизненные особенности, равен 6 млрд.п.н. Следовательно, и покрытие, которое можно считать достаточным для секвенирования диплоидного генома человека, будет уже 60-ти кратным или около того⁵. И к этому вопросу мы еще вернемся при рассмотрении секвенирования геномов древних людей. А пока отметим, что сборка *de novo* коротких прочтений позволяет формировать контиги и скаффолды, что до сих пор принимается за черновой геном, если для этого вида организма он секвенируется впервые и, следовательно, его сборка ведется без использования какого-либо шаблона в виде референсного генома. При этом такие черновые геномы представляют собой в абсолютно произвольном порядке мозаичное чередование участков пар гомологичных хромосом, доставшихся организму от каждого из его родителей в виде одинарного набора хромосом, и поэтому такой «полный» геном правильнее считать квазигапloidным, на что мы уже неоднократно обращали внимание

⁴ если не принимать во внимание присущую многим растениям полиплоидность, включая палеополиплоидность и последующую функциональную диплоидизацию

⁵ на самом деле, одного этого недостаточно

[Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2020; Баймиев и др. (Baymieiev et al.), 2022].

Следующим уровнем полноты секвенированного генома является по-хромосомная сборка, когда все контиги и скаффолды располагаются в соответствии с их нахождением в составе конкретных хромосом. При этом допускаются непрочитанные бреши, отображаемые в базах данных как множественные “N”, что символизирует возможное присутствие любого из четверки нуклеотидов (точное число которых в виде N, как правило, остается неизвестным) в каждом таком месте, а также несобранные концы хромосом из теломер. Недавно достигнут новый уровень сборки уже от теломеры до теломеры, получивший название T2T (Telomere-to-Telomere), но и в этом случае геном останется квазигапloidным. Однако недавно было продемонстрировано, что если для T2T секвенирования были взяты клетки человека гомозиготной линии с кариотипом 46,XX, то это позволило собрать без пробелов все хромосомы в их действительно гапloidном варианте⁶ общим размером 3,055 млрд.п.н. и исправить все ошибки предыдущих сборок [Aganezov et al., 2022; Nurk et al., 2022]. Последовавшие затем отклики их коллег свидетельствуют, что полученные данные, несомненно, представляют передовой уровень знаний о геноме человека и будут служить новым эталонным геномом CHM13, лишенным весьма многочисленных ошибок прежних сборок [Commentary, 2022; Lupski, 2022].

Но чтобы собрать действительно полный геном человека, которым может быть только диплоидный, прочитанный к тому же в формате T2T, необходимо проводить гаплотипную сборку фазированных участков ДНК по-хромосомно, исключительно *de novo*. При этом требуется увеличенное покрытие генома при его секвенировании, комбинация менее точных длинных и высокоточных коротких прочтений, прочие ухищрения в виде оптического картирования и/или трио-секвенирования, а также использование соответствующих программ и алгоритмов для подобной фазированной сборки. Таких диплоидных геномов пока немного, но именно они представляют наибольший интерес, как для медицины, так и для популяционных исследований. При этом верится, что дальнейшее совершенствование технологий секвенирования ДНК новейших поколений, позволит осуществлять сборку диплоидных геномов значительно легче.

Еще раз повторим, что только диплоидные геномы с фазированной гаплотипной сборкой в формате *de novo* могут дать полноценную

⁶ за небольшими исключениями, на что указывают сами авторы

информацию об особенностях структурной организации всех аллелей парных хромосом.⁷ В противном случае, в том числе при использовании для сборки эталонного генома есть риск получения в итоге искаженной информации о популяционных частотах встречаемости тех или иных полиморфных нуклеотидов в сцеплено наследуемых блоках и/или о здоровье носителя генома, прочитанного для него в квазигапloidном виде. Так, в частности определение того является ли некий полиморфизм в виде двух однонуклеотидных замен, находящихся по отношению друг к другу в *цис*- или *транс*-положении, часто является критичным моментом при оценке их вероятностного биологического эффекта. Например, наличие двух потенциальных мутаций в кодирующей последовательности может привести к незначительному изменению фенотипа или даже к не проявлению таких мутаций, если они являются *цис*-по отношению друг к другу, в то время как они могут вызвать потерю функции, если они окажутся в *транс*-положении. Или наоборот. В популяционных исследованиях также возникнет иная ситуация при учете тех же однонуклеотидных замен в их *цис*- и *транс*-положениях относительно друг друга при сцепленном наследовании, фактически кардинально меняя взгляд на структуру популяции. Для подтверждения этого достаточно привести примеры подсчета числа возможных комбинаций в неких условных микрогаплотипах.⁸ Если при сцепленном наследовании отдельных участков хромосом в биаллельном снипе один полиморфный нуклеотид в *цис*-положении не рассматривать вкпе с некоторыми полиморфными нуклеотидами из расположенных неподалеку других биаллельных снипов, которые в реальности будут по отношению к первому находиться в *транс*-положении, то картина особенностей конкретной популяции будет искажена.

⁷ Хотя это не имеет прямого отношения к теме данной статьи, но, возможно, стоит заметить, что верхней «планкой» исследования организации генома является определение его пространственной конфигурации, обозначаемой как “3D genome” [Bouwman et al., 2022], интерес к которой в последние годы заметно растет, но ее установление требует использования различных методов картирования хромосом, *in situ* секвенирования посредством лигирования и множества прочих подходов, разрешающая способность которых является пока достаточно грубой, достигая в лучшем случае около одной тысячи пар нуклеотидов.

⁸ Рассматриваемые вместе парные микрогаплотипы все же удобнее называть микродиплотипами, что нами не так давно предложено [Чемерис и др. (Chemieris et al.), 2020].

Чтобы не быть голословными приведем примеры подобных расчетов. Так, для трех биаллельных снипов максимальное число возможных комбинаций составит всего 8, тогда как для этих же снипов в составе микродиплотипов с учетом *цис*- и *транс*-положений полиморфных нуклеотидов в них число вероятностных комбинаций резко возрастает и подчиняется формуле $[N \times (N+1)]/2$, где N – число микрогаплотипов. Таким образом, вместо упомянутых выше 8 комбинаций количество таковых для наследуемых сцеплено трех биаллельных снипов заметно возрастет и составит уже 36 с дальнейшим экспоненциальным ростом этой разницы по мере увеличения числа берущихся в анализ микро(га)диплотипов.

Попутно стоит коснуться некоторых других терминов. Так, больше столетия назад в 1920 г. был предложен термин «геном», характеризующий гаплоидный набор хромосом. Разработка методов секвенирования ДНК позволила для различных организмов со временем определять их полные геномы, которые фактически оказывались квазигаплоидными. При этом в литературе можно встретить обозначение таких секвенированных геномов как «моноплоидные» [Gargmeur et al., 2018], отталкиваясь от термина «моноплоидный геном», используемого при подсчете количественного содержания ДНК в ядре в виде C-value [Greilhuber et al., 2005], соответствующего всей ДНК в одиночном наборе хромосом (1C-value) число которых обозначается как “x”. Хотя для диплоидных организмов, коим является человек, такое обозначение вполне подходит - все же оно не универсально, поскольку для растений будет соответствовать базовому числу хромосом (“b”), а никак не гаплоидному набору (“n”) полиплоидного организма, претерпевшего функциональную диплоидизацию. Поэтому нам представляется, что термин «квазигаплоидный геном» больше отражает суть того, что обычно нынешними методами секвенируется.

Возвращаясь к диплоидным геномам, следует сказать, что они могли бы получить свой собственный термин «дигеном» или более коротко «дином», что через некоторое время может быть вполне востребовано. Но это был бы общий термин для всех видов высших организмов. Что касается человека, то его квазигаплоидные и диплоидные геномы можно также обозначать как, например, «геном 3.0» и «геном 6.0» соответственно, исходя из количеств миллиардов пар азотистых оснований в одинарном и двойном наборах хромосом этого вида.

В этой связи следует обратить внимание на статью известного специалиста в области секвенирования геномной ДНК (и не только) Дж.К.Вентера [Venter, 2010], написанную им через

десятилетие после обнаружения в 2001 г. первых черновых геномов человека. Так, Вентер отмечает, что при обсуждении и формировании международного проекта «Геном человека» возникало немало вопросов по реальности его выполнения и высказывались опасения, что он отвлечет слишком много денег от других проектов биологических исследований, что в итоге вылилось в то, что было принято решение ограничиться секвенированием половинного набора хромосом и, следовательно, секвенированием ориентировочно 3 млрд.п.н. вместо 6 млрд.п.н., причем, по его мнению, это послужило серьезным сдерживающим фактором для развития новых технологий секвенирования ДНК⁹ и было большой ошибкой. Чтобы ее хоть как-то исправить возглавляемый им коллектив секвенировал персональный геном самого Вентера в диплоидном формате насколько тогда позволяли технологии [Levy et al., 2007]. При этом секвенирование осуществлялось классическим методом Сэнгера с высокоточными и относительно длинными прочтениями. Сборка велась в формате *de novo*, что является «краеугольным камнем» для исключения пропуска индивидуальных отличий персональных геномов. Тогда же было сообщено о секвенировании персонального диплоидного генома Нобелевского лауреата Дж.Уотсона [Wheeler et al., 2008]. При этом геном Уотсона стал первым, секвенированным с помощью методов новых поколений, но для его сборки использовался эталонный геном человека, что практически исключало выявление всех уникальных особенностей (в первую очередь инделов) генома Нобелевского лауреата. Возвращаясь к геному Вентера, нужно отметить, что было обнаружено, что «материнская» часть его генома с учетом инделов отличалась от «отцовской» на 0,5%, что довольно много, тогда как в 2001 г. различия геномов (формата 3.0) неродственных людей считалось, что достигают только 0,1%. Сейчас выяснено, что геномы разных людей могут отличаться на 1 – 3%. Поскольку геном 6.0 каждого человека, строго говоря, состоит из двух РАЗНЫХ 3.0 геномов, то различия между ними («внутри» одного человека) могут быть также весьма существенными.

Вообще о полиморфизме ДНК (современного) человека нужно сказать особо. Когда в 2001 г. были прочитаны первые два квазигаплоидных генома (причем далеко не полностью), число выявленных SNP¹⁰ составило всего около миллиона и следующим этапом, помимо заполнения непрочитанных брешей, стало выяснение полиморфизма ДНК у разных

⁹ мы полностью солидарны с этим

¹⁰ SNP – Single Nucleotide Polymorphism, читается как «снип» и соответствует однонуклеотидным заменам

популяций, для чего был запущен проект НарМар. В те годы считалось, что наиболее массовые полиморфные однонуклеотидные замены в геномах разных людей встречаются в среднем через каждые 500 – 1000 нуклеотидов. Сейчас количество валидированных SNP для генома человека насчитывает больше 100 миллионов, но насколько оно соответствует реальности для всего человечества – большой вопрос. В качестве подтверждения огромного полиморфизма ДНК человека приведем выхваченный наугад участок генома, благодаря тому, что в базе данных dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) в поисковую строку нами был набум введен номер некоего снипа rs765490¹¹, оказавшегося тетрааллельным и расположенным в эталонном геноме GRCh38.p13 на хромосоме 1 в положении 112152098 (рис. 1). Из отображенных на рис. 1 приблизительно 100 нуклеотидов эталонной последовательности генома человека видно, что инделов разной протяженности (class 2, подсвеченные сиреневым цветом прямоугольниками; не путать с выделением цветом самого снипа rs765490) и снипов (class 1, подсвеченные красным цветом прямоугольниками) для этого фрагмента уже известно свыше четырех десятков и лишь для 10 нуклеотидов между снипами rs1022660831 и rs1398173803 у секвенированных к настоящему времени геномов разных людей не обнаружено каких-либо вариаций. При этом нет никаких гарантий, что в очередных полностью секвенированных геномах у других людей не будут найдены полиморфные нуклеотиды именно в этой зоне. Так, например, в ходе выполнения проекта Simons Genome Diversity Project, в том числе с участием коллег из нашего Института при секвенировании 300 геномов из 142 разных популяций было выявлено 5,8 млн.п.н., ранее не представленных в эталонном геноме [Mallick et al., 2016].

Можно смело утверждать, что уникальных человеческих геномов столько же, сколько людей на Планете, причем, если ранее считалось, что монозиготные близнецы несут абсолютно одинаковые геномы¹², то недавно показано, что за счет постзиготических мутаций небольшие отличия между ними все же есть [Jonsson et al., 2021]. Более того, поскольку в данной статье затрагивается тема древней ДНК и ее также необходимо секвенировать (к чему ниже перейдем), то с учетом когда-либо живших людей современного анатомического типа общее

¹¹ далеко не любому номеру соответствует свой снип, но в данном случае просто повезло

¹² отличающееся метилирование цитозиновых остатков у однойцевых близнецов здесь ввиду не имеем

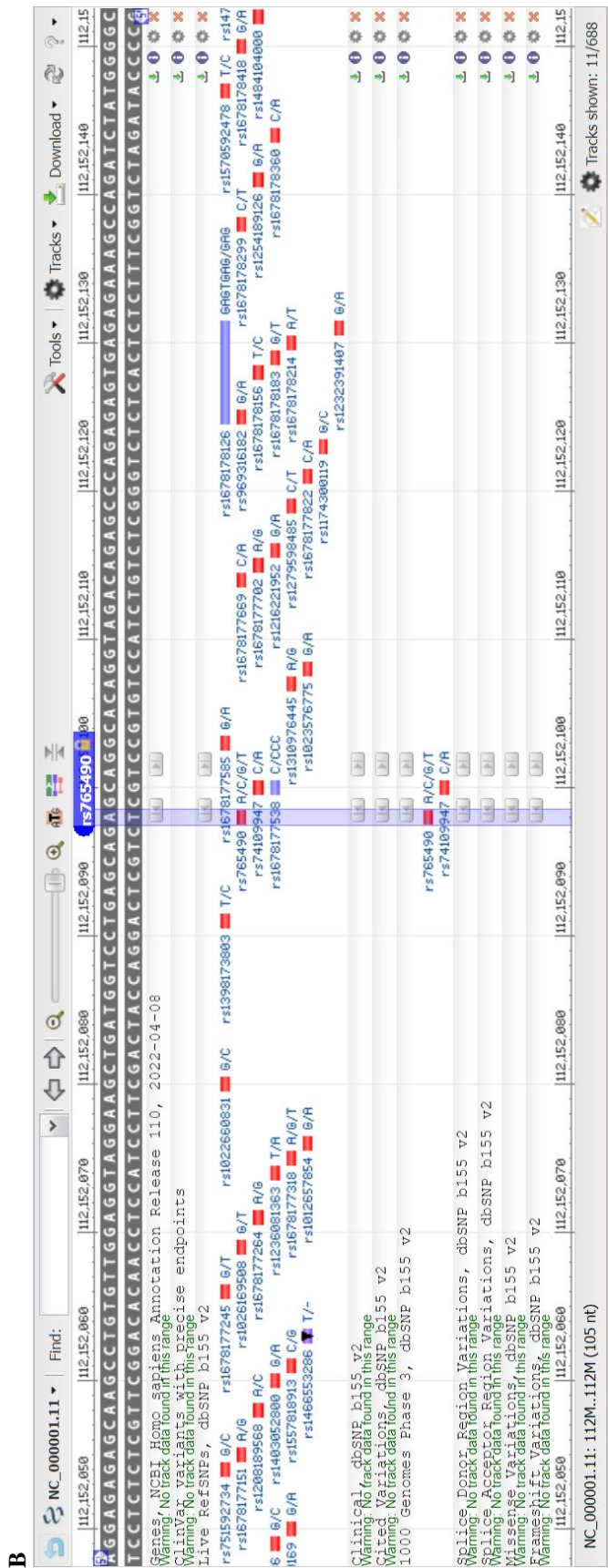
число отличающихся геномов формата 6.0 превышает 100 миллиардов, и они все уникальны. К ним следует прибавить еще порядка 100 миллионов аналогичных 6.0 геномов неандертальцев, каждый из которых также абсолютно уникален и в этом не может быть сомнений, несмотря на то, что считается, что биоразнообразие неандертальцев было ниже. Таким образом, при секвенировании полных геномов, как современных людей, так и архаичных гоминин неизбежно приходится сталкиваться с их огромным разнообразием, что с одной стороны обеспечивает нужный для многих целей полиморфизм молекул ДНК в должном объеме, а с другой – создает определенные трудности при проведении различных экспериментов.

Несмотря на то, что Вентер в той своей статье [Venter, 2010] акцентировал внимание на необходимости секвенирования диплоидных геномов, но видимо, не все ее читали. Так, в 2012 г. вышла статья других американских авторов [Roberts et al., 2012] из известного медицинского центра, в которой они рассуждали о предиктивной емкости персональных геномов, но при этом ни словом не обмолвились о необходимости установления нуклеотидных последовательностей обоих аллелей всех генов и о фазированной гаплотипной сборке. Более того, в трех комментариях к этой статье также не поднимался вопрос о диплоидном статусе геномов, как будто люди – не диплоидные организмы.

Вентер, заканчивая ту статью [Venter, 2010], задался вопросом – какая будет геномика через 10 лет и предположил, что благодаря улучшению технологий секвенирования для каждого человека уже будут секвенироваться множественные его геномы из сперматозоидов, яйцеклеток, стволовых клеток¹³. Завершил свою статью Вентер словами, что «геномная революция только начинается». Сейчас, по прошествии с того момента более десятка лет, можно сказать, что революция по-прежнему только начинается, несмотря на значительное повышение производительности и точности секвенирования. Эта революция, помимо развития и совершенствования технологий секвенирования и программного обеспечения, должна была произойти в умах исследователей, но этого в массе своей не случилось, и по-прежнему массово продолжают секвенироваться квазигапloidные геномы, ценность которых крайне низка, поскольку уже давно стало ясно как в структурном плане организован человеческий геном, какие в нем присутствуют повторяющиеся и прочие элементы, и принципиально новой информации такие квазигапloidные последовательности фактически не несут.

¹³ пока все же до этого дело не дошло

Рис. 1. Тетрааллельный сайт rs765490 с частотами встречаемости конкретных нуклеотидов в нем (A) и его локализация на хромосоме 1 эталонного генома GRCh38 (B). Пояснения в тексте
 Fig. 1. Tetraallelic SNP rs765490 with frequencies of occurrence of specific nucleotides in it (A) and its localization on chromosome 1 of the reference genome GRCh38 (B). Explanations in the text



При этом диплоидные геномы человека формата 6.0, которых пока совсем немного, представляют собой новое поколение геномных данных, необходимых для осуществления персонифицированной и предиктивной медицины в будущем, а также несут важную информацию для популяционных исследований. Но нынешние технологии высокопроизводительного секвенирования все же не позволяют сделать такое секвенирование рутинным, как это уже имеет место для (квази)гаплоидных геномов. Требуются принципиально новые технологии секвенирования как отдельных участков ДНК так и, конечно же, полностью полных геномов. Все же передовые рубежи в полногеномном секвенировании будущего и даже уже настоящего – это секвенирование фазированных (диплоидных) геномов, по-хромосомно, от теломеры до теломеры. И уже есть, по крайней мере, некоторые (частичные) примеры подобных геномов для человека, некоторых животных организмов, а также для растений.

Здесь можно еще заметить, что после неизбежного появления в будущем новой технологии секвенирования ДНК, позволяющей вести более уверенную сборку фазированных последовательностей, практически все нынешние квазигаплоидные геномы (тем более, если они были собраны по эталонному геному) придется секвенировать заново, поскольку это будет сделать проще, чем пытаться восстановить из них (секвенированных ранее) правильное распределение по парным хромосомам фрагментов ДНК на основе новых данных. Чтобы была понятна эта мысль, стоит привести пример из настоящего, когда, например, намереваясь секвенировать полный геном того или иного вида любого организма, авторы подобного проекта, чтобы как-то уменьшить (облегчить) себе работу, отнюдь не рюкуют в GenBank на предмет того что уже было секвенировано для этого объекта¹⁴ до них, а вместо этого целенаправленно определяют всю последовательность генома от начала до конца, доверяя, в первую очередь, своим данным. К тому же это просто невозможно - исключать из фронтального секвенирования какие-то уже секвенированные гены, их фрагменты или прочие участки генома. Когда появится новая подходящая технология, то же будет происходить и при секвенировании диплоидных геномов, и поэтому нынешнюю информацию о квазигаплоидных геномах людей можно рассматривать лишь как временную, пригодную для ограниченного набора анализов.

Сейчас нужна уже информация обо всей ДНК, об обоих аллелях, формирующих диплоидный геном 6.0, и отсюда, что усиливается движение в этом направлении. При этом еще в 2010 г. другими авторами [Li et al., 2010] было предложено составлять не один эталонный геном, а формировать так называемый пангеном, который бы нес информацию о полиморфизме ДНК сразу многих людей и он был бы тогда составлен на основе сборки *de novo* ряда известных геномов, приведших к обнаружению отсутствующих в эталонном геноме последовательностей. Только спустя годы в 2019 г. был создан специальный консорциум Human Pangenome Reference Consortium, нацеленный на составление удовлетворяющего многим условиям пангенома человека. Для подтверждения идущего прогресса в этой области можно привести недавние обзорные статьи по пангеномам людей [Miga, Wang, 2021; Wang et al., 2022], в которых отмечается необходимость замены нынешнего эталонного (квазигаплоидного) генома GRCh38, составленного не на основе, а из фрагментов геномов более чем 20 человек с 70% представленностью одного человека, что пангеномом считаться, конечно же, не может. Также наряду с необходимостью создания пангеномов на основе большого количества индивидуальных геномов в этих обзорах подчеркивается важность установления диплоидных фазированных геномов в формате T2T и обязательность их сборок *de novo*, позволяющую выявлять уникальность отдельных геномов каждого. Хотя с учетом упоминавшегося выше полиморфизма ДНК всех живших и живущих людей, проиллюстрированного на рис. 1, составление полностью универсального пангенома все же вряд ли возможно.

Исходя из используемых ныне наиболее массово технологий полногеномного секвенирования полные геномы людей, прочитанные в квазигаплоидном варианте или 3.0 можно также считать индивидуальным пангеномом каждого человека, но ценность таковых весьма сомнительна.

«Полные» геномы древних гоминин

Появление метода ПЦР, дальнейшее развитие технологий секвенирования и биоинформатической обработки данных позволили секвенировать геномы не только ныне живущих людей, но и древних организмов, включая гоминин, насчитывающих многие десятки и сотни тысяч лет. Однако сохранность молекул ДНК в таких образцах резко отличается от современной и сильно зависит от окружающей среды, где находились древние артефакты, а также от их возраста [Dabney et al., 2013]. В древних костных останках ДНК подвержена разрушению за счет химических изменений, основными из которых следует считать гидролиз и

¹⁴ здесь имеются ввиду какие-либо гены, прочие фрагменты ДНК, секвенированные ранее

окисление. Так, гидролиз приводит в большинстве случаев к дезаминированию цитозинов, апуринизации, реже к апириминизации. Окисление наиболее часто превращает гуанин в его 8-гидроксипроизводное. Для отображения происходящих процессов можно привести короткую «последовательность» в виде одной цепи ДНК из четырех разных азотистых оснований с указанием мест химического воздействия на них (рис. 2).

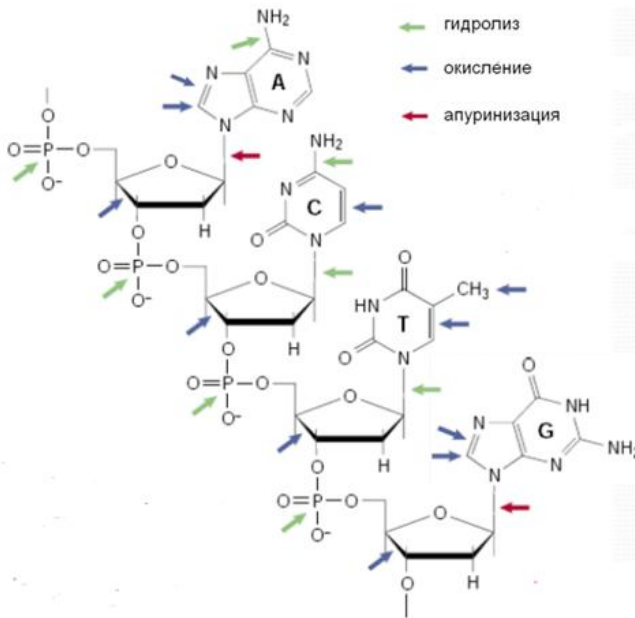


Рис. 2. Потенциальные места разрушения цепи ДНК и основные химические модификации различных азотистых оснований

Fig. 2. Potential sites of decomposition of the DNA chain and the main chemical modifications of various nitrogenous bases

Проблема постмортальной модификации цитозинов (в отсутствие ферментативной репарации) оборачивается еще и тем, что некоторая часть обычных цитозинов превращается в урацилы, а метилированные цитозины – в тимины. В результате оба этих азотистых основания (цитозин и его производное метилцитозин) при проведении ПЦР с древней ДНК приводят к появлению на комплементарной цепи «неправильных» аденинов вместо «правильных» гуанинов (по отношению к исходной последовательности в жившем организме). Однако если использовать гликозилазную обработку, то урацил, как несвойственное азотистое основание для ДНК, будет удален, а тимин (бывший метилцитозин) останется нетронутым и вовлеченным в амплификацию *in vitro* и в последующее секвенирование, что также составляет отдельную

проблему из-за возможных ошибок при установлении исходной нуклеотидной последовательности.¹⁵ Считается, что по краям сохранившихся древних молекул ДНК дезаминирование происходит чаще ввиду их возможного одноцепочечного состояния, что даже служит некоей гарантией древности образца при секвенировании [Briggs et al., 2007]. Не менее важно то, что фосфодиэфирная цепь неизбежно рвется и размер сохраняющихся фрагментов ДНК резко уменьшается, обычно не превышая для древней ДНК 200 п.н. с максимумом представленных обрывков, приходящимся на 30 – 50 п.н., что крайне мало для полноценной сборки геномов *de novo*. Хотя относительно недавно сообщено о специализированной программе PyDamage, рассчитанной на сборку контигов на основе древней ДНК как раз в формате *de novo* [Borru et al., 2021]. Однако древняя ДНК человека обычно собирается в контиги и в «полный» геном преимущественно путем наложения коротких секвенированных участков на эталонную последовательность генома современного человека, что как уже говорилось выше, исключает возможность установления индивидуальности каждого образца, а в случае с древними образцами может вообще приводить к потере каких-либо участков генома. И уж ни о каком полном диплоидном геноме 6.0 с фазированной сборкой для древних образцов вести речь нельзя. Таким образом, гаплотипное сравнение древнего генома с прочими геномами, как с такими же древними, так и современными полноценно производиться не может, что серьезно ограничивает получение наиболее достоверной информации.

В одной из работ [Barlow et al., 2020] описана программа Consensify, позволяющая вести сборку древнего генома на основе эталонной последовательности, но по утверждению авторов с уменьшенным числом ошибок, однако игнорируя при этом (по их словам) гетерозиготные последовательности и создавая псевдогаплоидный геном, когда из прочтений с низким или средним покрытием выбирается большее число раз прочитанный тот или иной нуклеотид. Причем сами авторы отмечают, что такой подход, опробованный ими на древней ДНК плейстоценовых пещерных медведей, приводит к ошибкам, способным исказить популяционный и филогенетический анализ. Что касается используемого этими авторами термина

¹⁵ Однако дезаминирование цитозинов и метилцитозинов и их превращения в разные азотистые основания – урацилы и тимины соответственно приводят к тому, что появляется возможность исследования эпигеномов древних гоминин [Orlando et al., 2015; Zhur et al., 2021].

«псевдогаплоидный геном», то нужно заметить, что он сродни «нашему» квазигаплоидному геному, однако эти две приставки несут несколько отличающийся смысл. Так, под «квази» понимается некое подобие, тогда как «псевдо» обычно подразумевает нечто ложное, что, впрочем, также недалеко от истины в случае собранных подобным образом гаплоидных (древних) геномов.

Также серьезнейшую проблему при анализе древней ДНК составляет загрязнение исследуемых образцов современной ДНК человека, которая из-за постоянно слущивающихся частичек кожи так или иначе контактирующего с чем угодно персонала потенциально может присутствовать везде, включая используемые реагенты, чему мы неоднократно уделяли значительное внимание [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2012; Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2014; Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2022]. На неизбежно присутствующую в древних образцах в очень больших количествах бактериальную ДНК все же позволительно «закрывать глаза», поскольку она может быть отринута при сборке контигов на основе различий в нуклеотидных последовательностях. При этом применяется обогащение разными способами секвенируемых образцов древней ДНК человека, включая специальные гибридизационные РНК-пробы [Soares, 2019], но в этих случаях необходимо учитывать, что из-за упомянутого выше огромного полиморфизма ДНК существует вероятность, что какие-то участки исследуемых геномов из первичного экстракта могут быть просто невыхваченными подобными зондами ввиду полного отсутствия гомологии или слишком низкого ее уровня, тем более, принимая во внимание, что древняя ДНК, как правило, представлена весьма короткими обломками, да еще и может быть модифицирована, что приводит к частичному изменению нуклеотидных последовательностей.

Для секвенирования древней ДНК и в частности ДНК человека предложено немало способов исключения загрязнения современной ДНК анализируемых препаратов [Rohland et al., 2014; Korlevic et al., 2015; Korelevic, Meyer, 2019; Farter et al., 2021], количественного определения такого загрязнения [Renaud et al., 2019]. Однако конфузы все равно случаются, и вместо древней ДНК (например, неандертальцев) иногда секвенируются современные загрязнения, на что было обращено внимание в одной из работ [Wall, Kim, 2007]. При этом определенную помощь в достоверности секвенирования древней ДНК выполняют компьютерные программы, позволяющие отсементировать древнюю ДНК от современной [Renaud et al., 2015; 2017; Peyregne, Peter, 2020; Huang, Ringbauer, 2022]. Одна из проблем секвенирования древней ДНК заключается также как

правило, в малом покрытии геномов ввиду нехватки пригодного материала для анализа, что не позволяет достоверно восстанавливать истинные последовательности азотистых оснований в исследуемых образцах, хотя есть примеры довольно высокого покрытия, о которых будет идти речь дальше.

Продолжающиеся на протяжении многих лет разработки способов полногеномного секвенирования с помощью методов новых поколений (NGS – Next Generation Sequencing) всегда преследовали цель повышения производительности процесса, не забывая, впрочем, об его точности. Так, если раньше для того, чтобы секвенировать геном человека потребовалось несколько лет и 300 параллельно работающих секвенаторов [Venter, 2010], то теперь для этого (получения необходимого объема первичных сырых данных с высоким покрытием) достаточно работы одного мощного прибора в течение нескольких часов¹⁶, что приблизительно соответствует ускорению процесса в миллион раз. При этом стоимость секвенирования генома человека также снизилась округленно со 100 млн. долларов до менее чем одной тысячи, что соответствует почти тем же 6 порядкам разницы. Причем нет сомнений, что она продолжит снижаться в будущем. Как и время, затрачиваемое на секвенирование генома, равного по размеру человеческому, но не для древней ДНК, на чем ниже специально акцентируем внимание.

Очень грубо методы NGS можно разделить на две группы – массовое параллельное секвенирование и мономолекулярное секвенирование, кратко рассмотренные нами недавно¹⁷ [Зубов и др. (Zubov et al.), 2021]. В настоящее время создалась ситуация, когда оба этих подхода дополняют друг друга при секвенировании полных геномов современных образцов за счет более длинных, но менее точных прочтений с помощью мономолекулярного секвенирования и высокоточных коротких прочтений методами массового параллельного секвенирования. При этом время, затрачиваемое на секвенирование полного генома человека, хорошо бы снижать еще дальше (без потери разрешения, конечно же), поскольку живущих людей, геномы которых (диплоидные или иначе формата б.0) нужно будет по разным причинам секвенировать, по крайней мере, многие миллионы или даже их сотни. И это некий бизнес даже, заставляющий разрабатывать новые

¹⁶ помимо пробоподготовки, которая не менее сложная была необходима и раньше

¹⁷ Ранее нами написана монография, в которой очень детально рассмотрены классические методы секвенирования ДНК, в том числе по методу Сэнгера [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 1999].

передовые технологии уже Next Next¹⁸ поколений. Совсем иная ситуация с древними образцами (причем не только гоминид), работы с которыми несут фактически если не единичный (штучный), то в любом случае куда менее масштабный характер, и поэтому нет нужды секвенировать их за очень короткое время. Древние геномы лучше секвенировать дольше, но лучше (точнее). С помощью именно мономолекулярного секвенирования, исключая любую амплификацию нуклеиновых кислот и потенциальное накопление, в том числе в ходе этого процесса нежелательных ошибок. При этом нынешние методы мономолекулярного секвенирования мало подходят для древних образцов хотя бы уже потому, что они рассчитаны на длинные прочтения, а молекул ДНК такой длины в древних образцах попросту нет. Следовательно, нужно разрабатывать новые технологии мономолекулярного секвенирования фактически 3N или N³ (Next Next Next) поколения, основанные на абсолютно иных принципах получения информации, пусть не быстрые, но которые без какого-либо этапа амплификации и/или ферментативного копирования были бы способны секвенировать короткие обрывки молекул ДНК, причем с высокой точностью однозначно определяя в них все нуклеотиды как они есть, включая урацилы, прочие модификации азотистых оснований, а также места в цепи ДНК без оных, что позволит с большей достоверностью восстанавливать изначальную последовательность древней ДНК. Несмотря на то, что в этом случае коммерции в плане оплаты секвенирования геномов их хозяевами не будет, поскольку те давно почил, тем не менее, важность для научных исследований в палеогеномике и палеоантропологии такого(их) метода(ов) секвенирования ДНК для древних геномов неоспорима и, можно надеяться, что он(и) рано или поздно появи(я)тся. Здесь будет уместно вспомнить знаменитый доклад другого Нобелевского лауреата Р.Фейнмана [Feynman, 1960], в котором он заглянул в технологическое будущее человечества и обратил внимание в том числе на биологию, предположив, что «... Вы будете видеть порядок [азотистых] оснований в цепи ...», имея в виду молекулу ДНК. При этом Фейнман отметил, что необходимо значительно повысить разрешение микроскопов, которые в то время оставались, по его мнению, достаточно «грубы». По-видимому, он имел в виду электронную микроскопию, с помощью которой позже пытались секвенировать молекулы ДНК [Bell et al., 2012], но неплохим потенциалом обладает и сканирующая

¹⁸ С нумерацией поколений методов секвенирования дела обстоят непросто, но не будем здесь заострять на этом внимание.

туннельная микроскопия [Tanaka, Kawai, 2010], применявшаяся для этой цели также отечественными авторами [Чаплыгин и др. (Chaplygin et al.), 2015]. Хотя необходимо признать, что подобные подходы нужно основательно улучшать.

Опять о возможном скрещивании неандертальцев и кроманьонцев

Разобравшись с полными геномами (какими они бывают), можно вернуться к вопросу о возможном скрещивании неандертальцев с кроманьонцами, используя данные полногеномного секвенирования. При этом сразу заметим, что, не ставя под сомнения никакие данные, мы, тем не менее, не будем принимать во внимание результаты таргетного секвенирования экзонов либо геномов древних гоминид или их полные геномы с низким покрытием, а будем опираться только на полностью секвенированные геномы древних людей с высоким покрытием.¹⁹ Поскольку выше мы обещали вернуться к вопросу покрытия геномов при их секвенировании, то делаем это сейчас, привлекая данные из статьи, в которой описывается полный геном мужчины современного анатомического типа, останки которого возрастом около 45 тысяч лет найдены на берегу Иртыша в Западной Сибири [Fu et al., 2014]. Эта работа примечательна тем, что при секвенировании удалось для аутосомной ДНК достичь высокого 42-х кратного покрытия. При этом для половых X- и Y-хромосом покрытие оказалось лишь приблизительно 22-х кратным. Все правильно²⁰, если исходить из того,

¹⁹ Еще раз стоит напомнить, что размер полного генома человека не 3 миллиарда пар нуклеотидов как принято ошибочно считать, а 6 миллиардов, тем более, что обычно для секвенирования берутся ткани с двойным набором хромосом, а что касается древних образцов, то для них других и быть не может, и поэтому приводимые в подавляющем большинстве авторами величины покрытия геномов при секвенировании (впрочем, не только древних организмов) нужно делить пополам.

²⁰ На самом деле в этой статье не все правильно, поскольку в ней приведена информация, что секвенированы 1,86 млрд.п.н., принадлежащих аутосомам (т.е. 44 аутосомам), а поскольку общий размер 45-ой и 46-ой X- и Y-хромосом составляет в сумме чуть более 200 млн.п.н. (154 и 57 млн.п.н. соответственно), то возникает законный вопрос – а куда подевался еще один млрд.п.н., которого не хватает до 3 млрд.п.н. гаплоидного генома человека? Конечно, возможно это тривиальная опечатка, но, к сожалению, в дальнейшем исправления (Erratum) не последовало, и это может вводить читателей в заблуждение.

что ими было секвенированы не 44 хромосомы, а 22 пары аутосом. Вот и увеличилось для них покрытие двукратно, поскольку по полученным данным велась сборка именно 22 парных хромосом, а не 44 самостоятельных. Фактически индивидуальный пангеном того древнего человека был ими построен. Поэтому с покрытием не все так просто и при нынешнем квазигапloidном секвенировании любых геномов его требуется делить на два, если про него (покрытие) в конкретных статьях специально не оговаривалось, что оно для генома человека пересчитано на 6 млрд.п.н.

В настоящее время для другого вида(ов) древнего человека известны нуклеотидные последовательности лишь четырех подобных геномов с высоким покрытием, из которых три - неандертальских [Prufer et al., 2014; 2017; Mafessoni et al., 2020] и один – денисовский [Meyer et al., 2012]. Но и для них, несмотря на приблизительно 30-ти кратное покрытие (по уверениям авторов, но не конкретизировавших, что оно на диплоидный геном, поэтому нужно считать его 15-ти кратным), сохраняются все те же проблемы, типичные для секвенирования любой древней ДНК в виде коротких прочтений, высокого уровня модификаций нуклеотидных последовательностей, в первую очередь дезаминирования цитозинов, низкого содержания эндогенной ДНК и присутствия в большом количестве ДНК бактериальной, а также потенциальное загрязнение ДНК современного человека. В частности, при секвенировании денисовского генома было определено, что загрязнение современной ДНК составило менее 0,5% [Meyer et al., 2012], что на самом деле немало для тщательных подсчетов и глобальных выводов. К тому же полные геномы архаичных гоминин собраны по эталонным последовательностям геномов современного человека и шимпанзе, что до некоторой степени лишает их индивидуальности, а также привносит определенные ошибки при сборке в дополнение к неточностям, которые могут происходить из-за модификаций азотистых оснований в древней ДНК. При этом сборка древних геномов *de novo* сильно затруднена ввиду наличия в исследуемом материале лишь относительно небольших обломков ДНК. Крайне желательно для уверенной сборки иметь относительно длинные прочтения древней ДНК, что плохо достижимо или почти недостижимо, однако мы знаем как можно попытаться этого добиться, но по понятным причинам писать здесь об этом не можем. Вообще крайне важно создать эталонный неандертальский геном, собранный исключительно *de novo*²¹, чтобы в дальнейшем его

можно было использовать в качестве референсного вместо эталонного генома современного человека, в тех случаях когда в силу низкого качества образцов ДНК сборка нового секвенированного древнего генома *de novo* принципиально невозможна. Тем не менее, секвенирование денисовского и неандертальского геномов с относительно большим покрытием [Meyer et al., 2012; Prufer et al., 2014] показало объединение двух хромосом шимпанзе (PTR12 и PTR13) в одну человеческую хромосому под номером 2 - HSA2, что было установлено секвенированием места слияния теломер, о чем говорилось выше и что явилось ключевым моментом для подтверждения отсутствия репродуктивного барьера древних гоминин. Спустя некоторое время для неандертальцев и денисовцев это было дополнительно показано и с помощью анализа альфа-сателлитной ДНК, продемонстрировав ее присутствие в месте исчезновения одной из центромер [Miga et al., 2017].

Но на самом деле и с образованием объединенной хромосомы обстоит не все так просто. Впервые место слияния в хромосоме 2 человека было секвенировано еще в 1991 г. и были обнаружены полные и частично редуцированные теломерные повторы TTAGGG, расположенные в нем «голова к голове» (в общей сложности более полутора сотен) и фланкированные предтеломерными последовательностями, типичными для хромосом человека [Jdo et al., 1991]. Позже выяснилось, что вблизи места слияния также расположены протяженные дубликации длиной около 40 т.п.н., которых у человека имеется всего 4 или 5 копий, тогда как у шимпанзе таковых 300 – 500 [Cheng et al., 2005]. При этом время образования «человеческой» хромосомы HSA2, по разным оценкам, основывающимся главным образом на скоростях эволюции нуклеотидных последовательностей этих и других повторов, колеблется от нескольких сотен тысяч лет до миллионов. Недавно произведен новый подсчет [Pozziewiecka et al., 2022], показывающий, что время слияния 2a и 2b хромосом укладывается в диапазон от 0,4 до 1,5 млн. лет и это может означать, что теоретически неандертальцы могли быть носителями 48 хромосом²². А с учетом сложности прочтения повторяющихся участков вообще, и в древней ДНК в особенности (из-за сохраняющихся обломков лишь очень малой длины к тому же с измененными

²¹ о по-хромосомной сборке, и тем более в формате T2T, для древних геномов можно даже не мечтать

²² в этом случае при носительстве неандертальцами 48 хромосом их скрещиванию с кроманьонцами это не препятствовало бы, но фертильного потомства возникать не могло и, следовательно, о передаче генетического материала потомкам речь идти не может, и при этом неважно, кто мать, а кто отец.

азотистыми основаниями), возможно, требуется уточнение этих последовательностей у древних гоминин, включая неандертальцев, и желательны методами секвенирования ДНК новейших поколений. Причем в одной из работ [Stankiewicz, 2016] высказывается точка зрения, что такое слияние, сопровождающееся потерей части генов шимпанзе (возможно правильное читать - древних гоминин, *H.rhodesiensis*, например), могло дать некое эволюционное преимущество носителям уже 46 хромосом. Исключать последнее действительно нельзя, но и доказать проблематично.

Все же одной из работ с низким (2,6 кратным = 1,3 кратным) покрытием секвенированного генома коснемся. В ней сообщается о секвенировании генома девочки, мать которой предположительно неандерталка, а отец – денисовец, при этом авторы сообщили, что загрязнение современной ДНК не превышает 1,7% [Slon et al., 2018]. К выводу о гибридном происхождении ребенка авторы пришли на основе более высокой гетерозиготности данного генома, несколько превышающей таковые для денисовского и неандертальского геномов, что позволяет считать, что в нем (в геноме условного формата 6.0) присутствуют как бы два сильно разных генома 3.0, соответствующих разным гаплоидным наборам хромосом. В этой связи можно еще заметить, что для скрещивания денисовцев и неандертальцев в принципе особых препятствий точно не было, учитывая, что это относительно близкие сестринские виды древних гоминин²³, имеющие, по всей видимости, в целом схожий менталитет и близкие уровни интеллектуального развития.

Было также сообщено о секвенировании с 30-ти (читай 15-ти) кратным покрытием генома неандертальской женщины, останки которой найдены в горах Алтая [Prufer et al., 2014]. В этой работе было определено, что ее геном довольно сильно гомозиготен, свидетельствуя, что ее родители были относительно близки друг другу генетически, что в принципе не должно удивлять, поскольку на Алтае все же неандертальцев было меньше, чем в Западной Европе. При сравнении с полными геномами 25 современных людей из разных географических территорий было установлено, что в них в том или ином объеме сохранились «следы» неандертальской ДНК и был даже составлен некий перечень таких

однонуклеотидных замен, однако как уже говорилось выше сейчас на Планете «живут» около 8 миллиардов разных «геномов 6.0», а если переводить на квазигаплоидные геномы, то их становится уже 16 миллиардов и может ли выборка 25 из них быть репрезентативной. А если еще учесть²⁴ всех когда-либо живших людей современного анатомического типа, то нужно вести речь уже о более чем 200 миллиардах геномов 3.0. Да и один неандертальский геном²⁵ из приблизительно когда-либо «проживавших» 100 миллионов, несмотря на их гораздо более низкий уровень полиморфизма, вряд ли может обеспечить должную представленность всех популяций и субпопуляций.

Спустя несколько лет был также с приблизительно 30-ти (с 15-ти) кратным покрытием секвенирован геном неандертальской женщины, чьи останки были обнаружены в одной из пещер Хорватии [Prufer et al., 2017]. Фактически авторы составили для нее два генома 3.0 (но не фазированных, а квазигаплоидных, по сути), анализ которых показал, что они отличались между собой в среднем всего 1,6 заменами на 10 тысяч нуклеотидов, что намного ниже, чем характерно для современных людей, подтверждая тем самым, что размеры популяций неандертальцев были небольшие. В этой работе также были обнаружены некие следы скрещивания неандертальцев с кроманьонцами при сравнении с геномами современных людей. Относительно недавно сообщено [Mafessoni et al., 2020] о секвенировании с 27,6 кратным (нужно опять-таки делить пополам) покрытием генома неандертальской женщины из пещеры «Чагырская» на Алтае, которая находится на расстоянии всего 106 км к западу от пещеры Денисовской, где ранее были найдены останки денисовцев. При этом данный геном оказался больше похож на геном западноевропейских неандертальцев, нежели на такой же алтайский [Prufer et al., 2014]. Однако роднило с последним его то, что уровень гомозиготности был довольно высоким, также свидетельствуя о меньших размерах популяций неандертальцев в Южной Сибири.

В настоящее время в литературе можно встретить множество публикаций, включая обзорные статьи, в которых говорится о присутствии неандертальской ДНК в геномах современных людей.

²³ Вполне возможно, что неандертальцы и денисовцы относятся к одному виду древних людей, но поскольку полного скелета денисовца еще не обнаружено, то, соответственно, восстановить его облик и принять решение по приданию ему статуса отдельного вида на основе морфологических отличий пока нельзя.

²⁴ а учитывать их нужно, в том числе и потому что неандертальцы если и скрещивались, то именно с древними кроманьонцами

²⁵ тем более из далекой Сибири, а не из Европы, где только скрещивания древних гоминин и могли происходить относительно массово

Отправной точкой для этого стала первая²⁶ публикация, в которой было сообщено о секвенировании полного неандертальского генома [Green et al., 2010]. Тогда была секвенирована ДНК шести неандертальцев – троих из одного места и еще троих из трех разных мест. В общей сложности стало известно около 5,3 млрд.п.н., что в итоге означает, что покрытие неандертальского диплоидного генома (а на другой статус и не нужно пересчитывать) было всего приблизительно 0,9-ти кратным. Помимо ДНК неандертальцев в той же работе были секвенированы современные полные геномы с относительно низким 4-х – 6-ти ($2^7 - 3^7$) кратным покрытием пяти человек из Южной и Западной Африки, Западной Европы, а также Юго-Восточной Азии. На основе встречаемости отдельных однонуклеотидных замен у разных людей, представляющих различные популяции, авторы эту информацию интерпретировали как результаты скрещивания кроманьонков с неандертальцами и пришли также к заключению, что неандертальцы имеют больше общего (на геномном уровне) с представителями Евразии, чем с народами, проживающими южнее пустыни Сахара. И с таким видением эволюции гоминин согласились многие, но не все. Так, ряд авторов посчитали, что причиной (виной) тому (если коротко) все же довольно высокий полиморфизм предковых популяций, который нужно было принимать во внимание [Eriksson, Manica, 2012; Lowery et al., 2013]. С ними солидарна д.б.н. С.А.Боринская, высказавшаяся на эту тему на ресурсе АНТРОПОГЕНЕЗ.РУ. На самом деле дело в используемых размерах выборок и берущихся в анализ геномов для сравнения в виде внешних групп. В частности, помимо генома шимпанзе нужно для сравнения использовать еще геномы других человекообразных обезьян. К тому же оперировать одним геномом шимпанзе²⁷, считая, что он на весь вид *P.troglodytes* один такой (не полиморфный) было нельзя. В качестве подтверждения этого тезиса в виде необходимости использования для сравнительного анализа увеличенного числа разных геномов можно

привести работу, в которой другие авторы [Kuhlwilm, Voeckx, 2019] составили некий каталог однонуклеотидных замен, отличающих древних людей от современных, и показали, что в отличие от ранее сообщенных 31389 таких сайтов [Prüfer et al., 2014] в их исследованиях количество таковых оказалось снижено до всего 12027 отчасти из-за включения в анализ другого архаичного индивида и главным образом благодаря ставшему известному позже большему полиморфизму ДНК современных популяций человека.

Если подобные скрещивания кроманьонков и неандертальцев имели место, то в более близких к тем событиям поколениях кроманьонцев при их полногеномном секвенировании должны выявляться более крупные «ДНК-следы», но, к сожалению таких работ можно сказать нет, за исключением тех, что анализировали «полные» геномы (или просто их отдельные части) живших в те далекие времена кроманьонцев с весьма низким покрытием ($>1^7 - 3,8^7 = >0,5^7 - 1,9^7$), а эту информацию мы в расчет решили не брать²⁸ ввиду возможных искажений реальных последовательностей у тогда живших людей и поэтому для того чтобы утвердительно ответить на вопрос были ли такие скрещивания необходимо секвенировать гораздо большее число геномов древних кроманьонцев и с максимально возможным покрытием. Но еще есть митохондриальный геном, наследуемый по материнской линии и как раз его проще²⁹ секвенировать у древних гоминин. Выше мы уже упоминали, что у современных людей неандертальского митогенома нет, но поскольку предполагается, что происходили (лишь) скрещивания кроманьонков и неандертальцев, то среди последних нужно искать митохондриальный геном, схожий с таковым людей современного анатомического типа. Но, к сожалению, такие пока тоже не найдены, хотя их известно уже около трех десятков. В том числе недавно секвенирован очередной, принадлежавший девочке из Мезмайской пещеры на Северном Кавказе,

²⁶ На самом деле еще раньше появилась другая статья (ее цитировать не имеет смысла), в которой сообщалось о секвенировании приблизительно одного млн.п.н., но тогда на проверку вышло, что около 70% взятой в анализ ДНК принадлежало не неандертальцу, а современному человеку, что обнаружилось при тщательном анализе тех чужих результатов другими авторами [Wall, Kim, 2007], о чем мы уже упоминали выше.

²⁷ как у человека ядерные геномы сильно отличаются один от другого, так и шимпанзе несомненно присущ аналогичный или скорее несколько меньший полиморфизм.

²⁸ При этом для подобного анализа и соответствующих выводов должны были секвенироваться геномы древних кроманьонцев, проживавших на территории Западной Европы, а не в далекой Сибири, и хотя мы знаем об одной такой работе, в которой сообщалось о секвенировании с довольно высоким покрытием генома человека современного анатомического типа, останки которого насчитывают около 45 тысяч лет, и цитированной нами выше [Fu et al., 2014], ее по этой чисто географической причине здесь оставили за пределами рассмотрения.

²⁹ за счет малого размера и высокой копийности в каждой клетке

причем эта работа выполнена полностью отечественными авторами [Andreeva et al., 2022], которыми в ходе своего исследования предложена иерархическая номенклатура гаплогрупп митохондриальной ДНК неандертальцев и построено филогенетическое древо, из которого видно, что все секвенированные пока митогеномы неандертальцев располагаются очень далеко от митогеномов современных людей. Но опять-таки секвенирована митохондриальная ДНК лишь у относительно небольшого числа неандертальцев и нужно продолжать эту работу в надежде найти точные доказательства скрещивания этих видов древних гоминин, в которых как уже говорилось отцом выступал неандерталец.

Но нельзя забывать и про ядерные геномы древних людей, и важны свидетельства присутствия кроманьонской ДНК в геномах живших тогда же неандертальцев. Но из мест их совместного проживания с высоким уровнем покрытия секвенирован лишь один такой геном из пещеры в Хорватии [Prufer et al., 2017], однако митохондриальная ДНК в нем оказалась неандертальского происхождения и, следовательно, это был не «гибрид». Из всей когда-либо жившей популяции неандертальцев (около 100 миллионов) из-за резкого снижения их численности на период их совместного существования с кроманьонцами приходится, скорее всего, лишь около одного миллиона, но и из него еще нужно найти «гибридов», образовавшихся в результате такого межвидового скрещивания или их ближайших потомков через несколько поколений. Поэтому задача в первую очередь для археологов не из легких.

Завершая данную статью, стоит еще заметить, что и убедительных археологических свидетельств межвидовых скрещиваний в виде проявления у найденных костяков признаков одного вида древнего человека в другом на основе тех или иных характерных черт скелета, черепной коробки, которые бы принимались за непреложные доказательства их гибридного происхождения всеми палеоантропологами до сих пор нет.

Заключение

Безусловно, древнюю ДНК нужно изучать и секвенировать, для чего все же крайне желательно появление новых мономолекулярных методов секвенирования, способных не быстро, но с высокой точностью определять типы азотистых оснований - какие именно сохранились, включая всевозможные постмортальные и прочие их модификации с тем, чтобы уверенно восстанавливать истинные нуклеотидные последовательности, принадлежавшие

жившим в стародавние времена индивидам.³⁰ Геномы же современных людей должны секвенироваться в формате 6.0, то бишь быть диплоидными, установленными по-хромосомно, от теломеры до теломеры, ведя их сборку исключительно *de novo*, что уже осуществляется, но пока не носит массовый характер. С учетом того, что каждый индивид несет свой уникальный геном 6.0, то таковых сейчас на планете Земля имеется около 8 миллиардов разных, поскольку двух одинаковых нет. Если прибавить к ним также уникальные геномы всех когда-либо живших людей современного анатомического типа, то их общее количество превысит, как считается 100 миллиардов. Что касается неандертальцев, то число их всех когда-либо живших за все время территориального и иного их господства на протяжении нескольких сотен тысяч лет по самым скромным подсчетам составляет не менее 100 миллионов и соответственно столько же разных геномов 6.0 тогда за тот период образовалось. И в этой связи возникает вопрос, какими должны быть репрезентативные выборки, чтобы в них были представлены все группы и подгруппы, популяции и субпопуляции как современных, так и древних людей. Причем особенности *цис*- и *транс*-распределения однонуклеотидных полиморфизмов, равно как и разнообразных инделов в данных выборках (для того, чтобы делать обоснованные заключения (о скрещиваниях)) должны быть такими же, как в генеральных совокупностях. Видимо подобные выборки, как по современным, так и по древним геномам, характеризующихся высоким покрытием, включая неандертальские и кроманьонские, должны быть немаленькими, явно превышающими те, на основе которых ранее пришли к выводам о присутствии за счет скрещивания между неандертальцами и кроманьонками некоего генетического материала (в виде однонуклеотидных замен в аллельных вариантах некоторых генов) давно вымерших неандертальцев в геномах ныне живущих людей. Поэтому пока, когда еще секвенированных геномов (преимущественно квазигапloidных) как современных, так и древних людей известно относительно немного, подобные выводы все же нужно делать с большей осторожностью, хотя ничего исключать действительно нельзя. При этом несколько удивляет выявляемый лишь односторонний поток генов, хотя найти доказательства обратного потока от кроманьонцев к неандертальцам, безусловно, гораздо сложнее.

³⁰ причем подобные подходы к секвенированию древней ДНК будут востребованы не только для человека, но и для прочих ископаемых останков

Работа выполнена в рамках государственного задания № 122041400169-2.

Литература

1. Баймиев Ал.Х., Кулуев А.Р., Матниязов Р.Т., Гарафутдинов Р.Р., Баймиев Ан.Х., Гималов Ф.Р., Чемерис Д.А., Кулуев Б.Р., Чемерис А.В. Разнообразие количественных оценок содержания ДНК в ядрах растений, их разброс, некоторые термины и понятия (геном, C-value, пангеном) // *Biomics*. 2022. Т.14(1). С.79-100. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-6
2. Гарафутдинов Р.Р., Нагаев Н.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В. Аутентичность, сохранность и доступность древней ДНК // *Вестник Башкирского университета*. 2015. Т. 20. № 2. С. 432-439.
3. Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В. Долговременное хранение молекул ДНК при комнатной температуре // *Biomics*. 2020. Т.12(4). С. 552-563. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-49
4. Гарафутдинов Р.Р., Чемерис Д.А., Сахабутдинова А.Р., Геращенко Г.А., Кулуев Б.Р., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал. Х., Салтыкова Е.С., Чемерис А.В. Почему вымерли неандертальцы и скрещивались ли они массово с кроманьонцами? (С палеодилетантской точки зрения, но с учетом данных полногеномного секвенирования образцов современной и древней ДНК) // *Biomics*. 2022. Т.14(2). С.134-155. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-11
5. Зубов В.В., Чемерис Д.А., Василов Р.Г., Курочкин В.Е., Алексеев Я.И. Краткая история методов высокопроизводительного секвенирования нуклеиновых кислот // *Biomics*. 2021. Т.13(1). С. 27-46. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-4
6. Кулуев Б.Р., Баймиев Ан.Х., Геращенко Г.А., Юнусбаев У.Б., Гарафутдинов Р.Р., Алексеев Я.И., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Сто лет гаплоидным геномам. Сейчас наступает время диплоидных // *Biomics*. 2020. Т.12(4). С. 411-434. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-33
7. Сахабутдинова А.Р., Михайленко К.И., Гарафутдинов Р.Р., Кириянова О.Ю., Сагитова М.А., Сагитов А.М., Чемерис А.В. Небиологическое применение молекул ДНК // *Biomics*. 2019. Т.11(3). С. 344-377. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-28
8. Чаплыгин Е.Ю., Морозов Р.А., Неволин В.К. О возможности анализа фрагментов биополимеров с помощью туннельной микроскопии // *Биофизика*. 2015. Т. 60(1). С. 32-37.
9. Чемерис А.В., Аминев Ф.Г., Гарафутдинов Р.Р., Анисимов В.А., Сагитов А.М., Хуснутдинова Э.К., Сахабутдинова А.Р., Чемерис Д.А., Михайленко К.И. ДНК-криминалистика. М.: Наука. 2022. 466 С.
10. Чемерис А.В., Ахунов Э.Д., Вахитов В.А. Секвенирование ДНК. М., Наука, 1999. 429 с.
11. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Вахитов В.А. Как исключить появление ложнопозитивных результатов при проведении полимеразной цепной реакции? // *Вестн. биотехнол. физ.-хим. биол.* 2012. Т. 8. № 3. С. 34-45.
12. Чемерис Д.А., Гарафутдинов Р.Р., Сагитов А.М., Сагитова М.А., Михайленко К.И., Зубов В.В., Василов Р.Г., Сломинский П.А., Анисимов В.А., Хуснутдинова Э.К., Алексеев Я.И., Курочкин В.Е., Лавров Г.С., Воробьев А.А., Аминев Ф.Г., Чемерис А.В. Микродиплотипы как новые маркеры для ДНК-идентификации личности // *Biomics*. 2020. Т.12(2). С. 300-317. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-17
13. Aganezov S., Yan S.M., Soto D.C. et al. A complete reference genome improves analysis of human genetic variation // *Science*. 2022. V.376(6588). eabl3533. doi: 10.1126/science.abl3533
14. Andreeva TV, Manakhov AD, Gusev FE, Patrikeev AD, Golovanova LV, Doronichev VB, Shirobokov IG, Rogaev EI. Genomic analysis of a novel Neanderthal from Mezmaiskaya Cave provides insights into the genetic relationships of Middle Palaeolithic populations // *Sci Rep*. 2022 Jul 29;12(1):13016. doi: 10.1038/s41598-022-16164-9
15. Barlow A, Hartmann S, Gonzalez J, Hofreiter M, Paijmans JLA. Consensify: A Method for Generating Pseudohaploid Genome Sequences from Palaeogenomic Datasets with Reduced Error Rates. *Genes (Basel)*. 2020 Jan 2;11(1):50. doi: 10.3390/genes11010050
16. Bell DC, Thomas WK, Murtagh KM, Dionne CA, Graham AC, Anderson JE, Glover WR. DNA base identification by electron microscopy. *Microsc Microanal*. 2012 Oct;18(5):1049-53. doi: 10.1017/S1431927612012615
17. Borry M, Hubner A, Rohrlach AB, Warinner C. PyDamage: automated ancient damage identification and estimation for contigs in ancient DNA de novo assembly. *PeerJ*. 2021 Jul 27;9:e11845. doi: 10.7717/peerj.11845
18. Bouwman BAM, Crosetto N, Bienko M. The era of 3D and spatial genomics. *Trends Genet*. 2022 Jun 6;S0168-9525(22)00118-4. doi: 10.1016/j.tig.2022.05.010
19. Briggs AW, Stenzel U, Johnson PL, Green RE, Kelso J, Prufer K, Meyer M, Krause J, Ronan MT, Lachmann M, Paabo S. Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 11;104(37):14616-21. doi: 10.1073/pnas.0704665104
20. Cheng Z, Ventura M, She X, Khaitovich P, Graves T, Osoegawa K, Church D, DeJong P, Wilson RK, Paabo S, Rocchi M, Eichler EE. A genome-wide

- comparison of recent chimpanzee and human segmental duplications. *Nature*. 2005 Sep 1;437(7055):88-93. doi: 10.1038/nature04000
21. Commentary. Implications of the first complete human genome assembly. *Genome Res*. 2022. V32(4). P.595-598. doi: 10.1101/gr.276723.122
22. Dabney J, Meyer M, Paabo S. Ancient DNA damage. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Jul 1;5(7):a012567. doi: 10.1101/cshperspect.a012567
23. Eriksson A, Manica A. Effect of ancient population structure on the degree of polymorphism shared between modern human populations and ancient hominins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Aug 28;109(35):13956-60. doi: 10.1073/pnas.1200567109
24. Farrer AG, Wright SL, Skelly E, Eisenhofer R, Dobney K, Weyrich LS. Effectiveness of decontamination protocols when analyzing ancient DNA preserved in dental calculus. *Sci Rep*. 2021 Apr 2;11(1):7456. doi: 10.1038/s41598-021-86100-w
25. Feynman R.P. There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics // *Engineering and Science* (California Institute of Technology). 1960. V23. P.22-36.
26. Fu Q, Li H, Moorjani P, Jay F, Slepchenko SM, Bondarev AA, Johnson PL, Aximu-Petri A, Prufer K, de Filippo C, Meyer M, Zwyns N, Salazar-Garcia DC, Kuzmin YV, Keates SG, Kosintsev PA, Razhev DI, Richards MP, Peristov NV, Lachmann M, Douka K, Higham TF, Slatkin M, Hublin JJ, Reich D, Kelso J, Viola TB, Paabo S. Genome sequence of a 45,000-year-old modern human from western Siberia. *Nature*. 2014 Oct 23;514(7523):445-9. doi: 10.1038/nature13810
27. Garsmeur O, Droc G, Antonise R, Grimwood J, Potier B, Aitken K, Jenkins J, Martin G, Charron C, Hervouet C, Costet L, Yahiaoui N, Healey A, Sims D, Cherukuri Y, Sreedasyam A, Kilian A, Chan A, Van Sluys MA, Swaminathan K, Town C, Berges H, Simmons B, Glaszmann JC, van der Vossen E, Henry R, Schmutz J, D'Hont A. A mosaic monoploid reference sequence for the highly complex genome of sugarcane. *Nat Commun*. 2018 Jul 6;9(1):2638. doi: 10.1038/s41467-018-05051-5
28. Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, Patterson N, Li H, Zhai W, Fritz MH, Hansen NF, Durand EY, Malaspinas AS, Jensen JD, Marques-Bonet T, Alkan C, Prufer K, Meyer M, Burbano HA, Good JM, Schultz R, Aximu-Petri A, Butthof A, Hober B, Hoffner B, Siegemund M, Weihmann A, Nusbaum C, Lander ES, Russ C, Novod N, Affourtit J, Egholm M, Verna C, Rudan P, Brajkovic D, Kucan Z, Gusic I, Doronichev VB, Golovanova LV, Lalueza-Fox C, de la Rasilla M, Fortea J, Rosas A, Schmitz RW, Johnson PLF, Eichler EE, Falush D, Birney E, Mullikin JC, Slatkin M, Nielsen R, Kelso J, Lachmann M, Reich D, Paabo S. A draft sequence of the Neandertal genome. *Science*. 2010 May 7;328(5979):710-722. doi: 10.1126/science.1188021
29. Greilhuber J., Dolezel J., Lysak M.A., Bennett M.D. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. *Ann Bot*. 2005. V.95(1). P.255-260. doi: 10.1093/aob/mci019
30. Huang Y, Ringbauer H. hapCon: Estimating Contamination of Ancient Genomes by Copying from Reference Haplotypes. *Bioinformatics*. 2022 Jun 13;38(15):3768–77. doi: 10.1093/bioinformatics/btac390
31. IJdo JW, Baldini A, Ward DC, Reeders ST, Wells RA. Origin of human chromosome 2: an ancestral telomere-telomere fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Oct 15;88(20):9051-5. doi: 10.1073/pnas.88.20.9051
32. Jonsson H, Magnúsdóttir E, Eggertsson HP, Stefánsson OA, Arnadóttir GA, Eiríksson O, Zink F, Helgason EA, Jónsdóttir I, Gylfason A, Jónasdóttir A, Jónasdóttir A, Beyter D, Steingrimsdóttir T, Norddahl GL, Magnússon OT, Masson G, Halldórsson BV, Thorsteinsdóttir U, Helgason A, Sulem P, Gudbjartsson DF, Stefánsson K. Differences between germline genomes of monozygotic twins. *Nat Genet*. 2021 Jan;53(1):27-34. doi: 10.1038/s41588-020-00755-1
33. Korlević P, Gerber T, Gansauge MT, Hajdinjak M, Nagel S, Aximu-Petri A, Meyer M. Reducing microbial and human contamination in DNA extractions from ancient bones and teeth. *Biotechniques*. 2015 Aug 1;59(2):87-93. doi: 10.2144/000114320
34. Korlević P, Meyer M. Pretreatment: Removing DNA Contamination from Ancient Bones and Teeth Using Sodium Hypochlorite and Phosphate. *Methods Mol Biol*. 2019;1963:15-19. doi: 10.1007/978-1-4939-9176-1_2
35. Kuhlwilm M, Boeckx C. A catalog of single nucleotide changes distinguishing modern humans from archaic hominins. *Sci Rep*. 2019 Jun 11;9(1):8463. doi: 10.1038/s41598-019-44877-x
36. Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP, Axelrod N, Huang J, Kirkness EF, Denisov G, Lin Y, MacDonald JR, Pang AW, Shago M, Stockwell TB, Tsiamouri A, Bafna V, Bansal V, Kravitz SA, Busam DA, Beeson KY, McIntosh TC, Remington KA, Abril JF, Gill J, Borman J, Rogers YH, Frazier ME, Scherer SW, Strausberg RL, Venter JC. The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol*. 2007 Sep 4;5(10):e254. doi: 10.1371/journal.pbio.0050254
37. Li R, Li Y, Zheng H, Luo R, Zhu H, Li Q, Qian W, Ren Y, Tian G, Li J, Zhou G, Zhu X, Wu H, Qin J, Jin X, Li D, Cao H, Hu X, Blanche H, Cann H, Zhang X, Li S, Bolund L, Kristiansen K, Yang H, Wang J, Wang J. Building the sequence map of the human pan-genome. *Nat Biotechnol*. 2010 Jan;28(1):57-63. doi: 10.1038/nbt.1596

38. Lowery RK, Uribe G, Jimenez EB, Weiss MA, Herrera KJ, Regueiro M, Herrera RJ. Neanderthal and Denisova genetic affinities with contemporary humans: introgression versus common ancestral polymorphisms. *Gene*. 2013 Nov 1;530(1):83-94. doi: 10.1016/j.gene.2013.06.005
39. Lupski J.R. Biology in balance: human diploid genome integrity, gene dosage, and genomic medicine. *Trends Genet*. 2022. V.38(6). P.554-571. doi: 10.1016/j.tig.2022.03.001
40. Mafessoni F, Grote S, de Filippo C, Slon V, Kolobova KA, Viola B, Markin SV, Chintalapati M, Peyregne S, Skov L, Skoglund P, Krivoschapkin AI, Derevianko AP, Meyer M, Kelso J, Peter B, Pruffer K, Paabo S. A high-coverage Neandertal genome from Chagyrskaya Cave. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Jun 30;117(26):15132-15136. doi: 10.1073/pnas.2004944117
41. Mallick S, Li H, Lipson M, Mathieson I, Gymrek M, Racimo F, Zhao M, Chennagiri N, Nordenfelt S, Tandon A, Skoglund P, Lazaridis I, Sankararaman S, Fu Q, Rohland N, Renaud G, Erlich Y, Willems T, Gallo C, Spence JP, Song YS, Poletti G, Balloux F, van Driem G, de Knijff P, Romero IG, Jha AR, Behar DM, Bravi CM, Capelli C, Hervig T, Moreno-Estrada A, Posukh OL, Balanovska E, Balanovsky O, Karachanak-Yankova S, Sahakyan H, Toncheva D, Yepiskoposyan L, Tyler-Smith C, Xue Y, Abdullah MS, Ruiz-Linares A, Beall CM, Di Rienzo A, Jeong C, Starikovskaya EB, Metspalu E, Parik J, Villems R, Henn BM, Hodoglugil U, Mahley R, Sajantila A, Stamatoyannopoulos G, Wee JT, Khusainova R, Khusnutdinova E, Litvinov S, Ayodo G, Comas D, Hammer MF, Kivisild T, Klitz W, Winkler CA, Labuda D, Bamshad M, Jorde LB, Tishkoff SA, Watkins WS, Metspalu M, Dryomov S, Sukernik R, Singh L, Thangaraj K, Paabo S, Kelso J, Patterson N, Reich D. The Simons Genome Diversity Project: 300 genomes from 142 diverse populations. *Nature*. 2016 Oct 13;538(7624):201-206. doi: 10.1038/nature18964
42. Meyer M, Arsuaga JL, de Filippo C, Nagel S, Aximu-Petri A, Nickel B, Martinez I, Gracia A, Bermudez de Castro JM, Carbonell E, Viola B, Kelso J, Pruffer K, Paabo S. Nuclear DNA sequences from the Middle Pleistocene Sima de los Huesos hominins. *Nature*. 2016 Mar 24;531(7595):504-7. doi: 10.1038/nature17405
43. Meyer M, Kircher M, Gansauge MT, Li H, Racimo F, Mallick S, Schraiber JG, Jay F, Pruffer K, de Filippo C, Sudmant PH, Alkan C, Fu Q, Do R, Rohland N, Tandon A, Siebauer M, Green RE, Bryc K, Briggs AW, Stenzel U, Dabney J, Shendure J, Kitzman J, Hammer MF, Shunkov MV, Derevianko AP, Patterson N, Andres AM, Eichler EE, Slatkin M, Reich D, Kelso J, Paabo S. A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual. *Science*. 2012 Oct 12;338(6104):222-6. doi: 10.1126/science.1224344
44. Miga KH. Chromosome-Specific Centromere Sequences Provide an Estimate of the Ancestral Chromosome 2 Fusion Event in Hominin Genomes. *J Hered*. 2017 Jan;108(1):45-52. doi: 10.1093/jhered/esw039
45. Miga KH, Wang T. The Need for a Human Pangenome Reference Sequence. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2021 Aug 31;22:81-102. doi: 10.1146/annurev-genom-120120-081921
46. Nurk S., Koren S., Rhie A. et al. The complete sequence of a human genome. *Science*. 2022. V.376(6588). P.44-53. doi: 10.1126/science.abj6987
47. Orlando L, Gilbert MT, Willerslev E. Reconstructing ancient genomes and epigenomes. *Nat Rev Genet*. 2015 Jul;16(7):395-408. doi: 10.1038/nrg3935
48. Peyregne S, Peter BM. AuthentiCT: a model of ancient DNA damage to estimate the proportion of present-day DNA contamination. *Genome Biol*. 2020 Sep 15;21(1):246. doi: 10.1186/s13059-020-02123-y
49. Poszewiecka B, Gogolewski K, Stankiewicz P, Gambin A. Revised time estimation of the ancestral human chromosome 2 fusion. *BMC Genomics*. 2022 Aug 25;23(Suppl 6):616. doi: 10.1186/s12864-022-08828-7
50. Pruffer K, de Filippo C, Grote S, Mafessoni F, Korlević P, Hajdinjak M, Vernot B, Skov L, Hsieh P, Peyregne S, Reher D, Hopfe C, Nagel S, Maricic T, Fu Q, Theunert C, Rogers R, Skoglund P, Chintalapati M, Dannemann M, Nelson BJ, Key FM, Rudan P, Kučan Ž, Gušić I, Golovanova LV, Doronichev VB, Patterson N, Reich D, Eichler EE, Slatkin M, Schierup MH, Andres AM, Kelso J, Meyer M, Paabo S. A high-coverage Neandertal genome from Vindija Cave in Croatia. *Science*. 2017 Nov 3;358(6363):655-658. doi: 10.1126/science.aao1887
51. Pruffer K, Racimo F, Patterson N, Jay F, Sankararaman S, Sawyer S, Heinze A, Renaud G, Sudmant PH, de Filippo C, Li H, Mallick S, Dannemann M, Fu Q, Kircher M, Kuhlwilm M, Lachmann M, Meyer M, Ongyerth M, Siebauer M, Theunert C, Tandon A, Moorjani P, Pickrell J, Mullikin JC, Vohr SH, Green RE, Hellmann I, Johnson PL, Blanche H, Cann H, Kitzman JO, Shendure J, Eichler EE, Lein ES, Bakken TE, Golovanova LV, Doronichev VB, Shunkov MV, Derevianko AP, Viola B, Slatkin M, Reich D, Kelso J, Paabo S. The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature*. 2014 Jan 2;505(7481):43-9. doi: 10.1038/nature12886
52. Renaud G, Hanghoj K, Willerslev E, Orlando L. gargammel: a sequence simulator for ancient DNA. *Bioinformatics*. 2017 Feb 15;33(4):577-579. doi: 10.1093/bioinformatics/btw670
53. Renaud G, Schubert M, Sawyer S, Orlando L. Authentication and Assessment of Contamination in

- Ancient DNA. *Methods Mol Biol.* 2019;1963:163-194. doi: 10.1007/978-1-4939-9176-1_17
54. Renaud G, Slon V, Duggan AT, Kelso J. Schmutzi: estimation of contamination and endogenous mitochondrial consensus calling for ancient DNA. *Genome Biol.* 2015 Oct 12;16:224. doi: 10.1186/s13059-015-0776-0
55. Roberts NJ, Vogelstein JT, Parmigiani G, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. The predictive capacity of personal genome sequencing. *Sci Transl Med.* 2012 May 9;4(133):133ra58. doi: 10.1126/scitranslmed.3003380
56. Rohland N, Harney E, Mallick S, Nordenfelt S, Reich D. Partial uracil-DNA-glycosylase treatment for screening of ancient DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015 Jan 19;370(1660):20130624. doi: 10.1098/rstb.2013.0624
57. Slon V, Mafessoni F, Vernot B, de Filippo C, Grote S, Viola B, Hajdinjak M, Peyregne S, Nagel S, Brown S, Douka K, Higham T, Kozlikin MB, Shunkov MV, Derevianko AP, Kelso J, Meyer M, Pruffer K, Paabo S. The genome of the offspring of a Neanderthal mother and a Denisovan father. *Nature.* 2018 Sep;561(7721):113-116. doi: 10.1038/s41586-018-0455-x
58. Soares AER. Hybridization Capture of Ancient DNA Using RNA Baits. *Methods Mol Biol.* 2019;1963:121-128. doi: 10.1007/978-1-4939-9176-1_13
59. Stankiewicz P. One pedigree we all may have come from - did Adam and Eve have the chromosome 2 fusion? *Mol Cytogenet.* 2016 Sep 26;9:72. doi: 10.1186/s13039-016-0283-3
60. Tanaka H, Kawai T. Partial sequencing of a single DNA molecule with a scanning tunnelling microscope. *Nat Nanotechnol.* 2009 Aug;4(8):518-22. doi: 10.1038/nnano.2009.155
61. Venter JC. Multiple personal genomes await. *Nature.* 2010 Apr 1;464(7289):676-7. doi: 10.1038/464676a
62. Wall JD, Kim SK. Inconsistencies in Neanderthal genomic DNA sequences. *PLoS Genet.* 2007 Oct;3(10):1862-6. doi: 10.1371/journal.pgen.0030175
63. Wang T, Antonacci-Fulton L, Howe K, Lawson HA, Lucas JK, Phillippy AM, Popejoy AB, Asri M, Carson C, Chaisson MJP, Chang X, Cook-Deegan R, Felsenfeld AL, Fulton RS, Garrison EP, Garrison NA, Graves-Lindsay TA, Ji H, Kenny EE, Koenig BA, Li D, Marschall T, McMichael JF, Novak AM, Purushotham D, Schneider VA, Schultz BI, Smith MW, Sofia HJ, Weissman T, Flicek P, Li H, Miga KH, Paten B, Jarvis ED, Hall IM, Eichler EE, Haussler D; Human Pangenome Reference Consortium. The Human Pangenome Project: a global resource to map genomic diversity. *Nature.* 2022 Apr;604(7906):437-446. doi: 10.1038/s41586-022-04601-8
64. Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, He W, Chen YJ, Makhijani V, Roth GT, Gomes X, Tartaro K, Niazi F, Turcotte CL, Irzyk GP, Lupski JR, Chinault C, Song XZ, Liu Y, Yuan Y, Nazareth L, Qin X, Muzny DM, Margulies M, Weinstock GM, Gibbs RA, Rothberg JM. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature.* 2008 Apr 17;452(7189):872-6. doi: 10.1038/nature06884
65. Zhur KV, Trifonov VA, Prokhortchouk EB. Progress and Prospects in Epigenetic Studies of Ancient DNA. *Biochemistry (Mosc).* 2021 Dec;86(12):1563-1571. doi: 10.1134/S0006297921120051

References

1. Aganezov S., Yan S.M., Soto D.C. et al. A complete reference genome improves analysis of human genetic variation // *Science.* 2022. V.376(6588). eabl3533. doi: 10.1126/science.abl3533
2. Andreeva TV, Manakhov AD, Gusev FE, Patrikeev AD, Golovanova LV, Doronichev VB, Shirobokov IG, Rogaev EI. Genomic analysis of a novel Neanderthal from Mezmaiskaya Cave provides insights into the genetic relationships of Middle Palaeolithic populations // *Sci Rep.* 2022 Jul 29;12(1):13016. doi: 10.1038/s41598-022-16164-9
3. Barlow A, Hartmann S, Gonzalez J, Hofreiter M, Paijmans JLA. Consensify: A Method for Generating Pseudohaploid Genome Sequences from Palaeogenomic Datasets with Reduced Error Rates. *Genes (Basel).* 2020 Jan 2;11(1):50. doi: 10.3390/genes11010050
4. Baymiev Al.Kh., Kuluev A.R., Matniyazov R.T., Garafutdinov R.R., Bayimiev An.Kh., Gimalov F.R., Chemeris D.A., Kuluev B.R., Chemeris A.V. The variety of quantitative estimates of the DNA content in plant nuclei and their dispersion, some terms and concepts (genome, C-value, pangenome). *Biomics.* 2022. V.14(1). P. 79-100. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-6 (In Russian)
5. Bell DC, Thomas WK, Murtagh KM, Dionne CA, Graham AC, Anderson JE, Glover WR. DNA base identification by electron microscopy. *Microsc Microanal.* 2012 Oct;18(5):1049-53. doi: 10.1017/S1431927612012615
6. Borry M, Hubner A, Rohrlach AB, Warinner C. PyDamage: automated ancient damage identification and estimation for contigs in ancient DNA de novo assembly. *PeerJ.* 2021 Jul 27;9:e11845. doi: 10.7717/peerj.11845
7. Bouwman BAM, Crosetto N, Bienko M. The era of 3D and spatial genomics. *Trends Genet.* 2022 Jun 6;S0168-9525(22)00118-4. doi: 10.1016/j.tig.2022.05.010
8. Briggs AW, Stenzel U, Johnson PL, Green RE, Kelso J, Pruffer K, Meyer M, Krause J, Ronan MT, Lachmann M, Paabo S. Patterns of damage in genomic

- DNA sequences from a Neandertal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 11;104(37):14616-21. doi: 10.1073/pnas.0704665104
9. Chaplygin E.Y., Morozov R.A., Nevolin V.K. On the possibility of biopolymer fragment analysis by tunneling microscopy. *Biophysics*. 2015. V.60(1).P 25-29.
 10. Chemeris A.V., Akhunov E.D., Vakhitov V.A. DNA sequencing. M., Nauka, 1999. 429 p.
 11. Chemeris A.V., Aminev F.G., Garafutdinov R.R., Anisimov V.A., Sagitov A.M., Khusnutdinova E.K., Sakhabutdinova A.R., Chemeris D.A., Mihaylenko K.I. DNK-kriminalistika. M.: Nauka. 2022. 466 S. [DNA criminalistics] (In Russian)
 12. Chemeris A.V., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Vakhitov V.A. How to exclude the appearance of false-positive results during the polymerase chain reaction? *Vestn. biotechnol. fiz.-chem. biol.* 2012. V. 8. No. 3. P. 34-45. (In Russian)
 13. Chemeris D.A., Garafutdinov R.R., Sagitov A.M., Sagitova M.A., Mikhailenko K.I., Zubov V.V., Vasilov R.G., Slominsky P.A., Anisimov V.A., Khusnutdinova E.K., Alekseev Ya.I., Kurochkin V.A., Lavrov G.S., Vorobev A.A., Aminev F.G., Chemeris A.V. Microdiplotypes as a new markers for DNA identification. *Biomics*. 2020. V. 12(2). P. 300-317. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-17 (In Russian)
 14. Cheng Z, Ventura M, She X, Khaitovich P, Graves T, Osoegawa K, Church D, DeJong P, Wilson RK, Paabo S, Rocchi M, Eichler EE. A genome-wide comparison of recent chimpanzee and human segmental duplications. *Nature*. 2005 Sep 1;437(7055):88-93. doi: 10.1038/nature04000
 15. Commentary. Implications of the first complete human genome assembly. *Genome Res*. 2022. V32(4). P.595-598. doi: 10.1101/gr.276723.122
 16. Dabney J, Meyer M, Paabo S. Ancient DNA damage. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Jul 1;5(7):a012567. doi: 10.1101/cshperspect.a012567
 17. Eriksson A, Manica A. Effect of ancient population structure on the degree of polymorphism shared between modern human populations and ancient hominins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Aug 28;109(35):13956-60. doi: 10.1073/pnas.1200567109
 18. Farrer AG, Wright SL, Skelly E, Eisenhofer R, Dobney K, Weyrich LS. Effectiveness of decontamination protocols when analyzing ancient DNA preserved in dental calculus. *Sci Rep*. 2021 Apr 2;11(1):7456. doi: 10.1038/s41598-021-86100-w
 19. Feynman R.P. There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics // *Engineering and Science* (California Institute of Technology). 1960. V23. P.22-36.
 20. Fu Q, Li H, Moorjani P, Jay F, Slepchenko SM, Bondarev AA, Johnson PL, Aximu-Petri A, Prufer K, de Filippo C, Meyer M, Zwyns N, Salazar-Garcia DC, Kuzmin YV, Keates SG, Kosintsev PA, Razhev DI, Richards MP, Peristov NV, Lachmann M, Douka K, Higham TF, Slatkin M, Hublin JJ, Reich D, Kelso J, Viola TB, Paabo S. Genome sequence of a 45,000-year-old modern human from western Siberia. *Nature*. 2014 Oct 23;514(7523):445-9. doi: 10.1038/nature13810
 21. Garafutdinov R.R., Chemeris D.A., Sakhabutdinova A.R., Gerashchenkov G.A., Morozov R.A., Matniyazov R.T., Kuluev B.R., Baymiev An.Kh., Baymiev Al.Kh., Saltykova E.S., Chemeris A.V. Why did Neanderthals become extinct? (From a paleodilettantish point of view but taking into account the data of whole genome sequencing of modern and ancient DNA specimens). *Biomics*. 2022. V.14(2). P. 134-155. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-11 (In Russian)
 22. Garafutdinov R.R., Nagaev N.R., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V. Authenticity, preservation and accessibility of ancient DNA // *Bulletin of Bashkir University*. 2015. V. 20(2). P. 432-439.
 23. Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V. Long-term room temperature storage of DNA molecules. *Biomics*. 2020. V. 12(4). P. 552-563. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-49 (In Russian)
 24. Garsmeur O, Droc G, Antonise R, Grimwood J, Potier B, Aitken K, Jenkins J, Martin G, Charron C, Hervouet C, Costet L, Yahiaoui N, Healey A, Sims D, Cherukuri Y, Sreedasyam A, Kilian A, Chan A, Van Sluys MA, Swaminathan K, Town C, Berges H, Simmons B, Glaszmann JC, van der Vossen E, Henry R, Schmutz J, D'Hont A. A mosaic monoploid reference sequence for the highly complex genome of sugarcane. *Nat Commun*. 2018 Jul 6;9(1):2638. doi: 10.1038/s41467-018-05051-5
 25. Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, Patterson N, Li H, Zhai W, Fritz MH, Hansen NF, Durand EY, Malaspinas AS, Jensen JD, Marques-Bonet T, Alkan C, Prufer K, Meyer M, Burbano HA, Good JM, Schultz R, Aximu-Petri A, Butthof A, Hober B, Hoffner B, Siegemund M, Weihmann A, Nusbaum C, Lander ES, Russ C, Novod N, Affourtit J, Egholm M, Verna C, Rudan P, Brajkovic D, Kucan Z, Gusic I, Doronichev VB, Golovanova LV, Lalueza-Fox C, de la Rasilla M, Fortea J, Rosas A, Schmitz RW, Johnson PLF, Eichler EE, Falush D, Birney E, Mullikin JC, Slatkin M, Nielsen R, Kelso J, Lachmann M, Reich D, Paabo S. A draft sequence of the Neandertal genome. *Science*. 2010 May 7;328(5979):710-722. doi: 10.1126/science.1188021
 26. Greilhuber J., Dolezel J., Lysak M.A., Bennett M.D. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. *Ann Bot*. 2005. V.95(1). P.255-260. doi: 10.1093/aob/mci019

27. Huang Y, Ringbauer H. hapCon: Estimating Contamination of Ancient Genomes by Copying from Reference Haplotypes. *Bioinformatics*. 2022 Jun 13;38(15):3768–77. doi: 10.1093/bioinformatics/btac390
28. Ijdo JW, Baldini A, Ward DC, Reeders ST, Wells RA. Origin of human chromosome 2: an ancestral telomere-telomere fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Oct 15;88(20):9051-5. doi: 10.1073/pnas.88.20.9051
29. Jonsson H, Magnusdottir E, Eggertsson HP, Stefansson OA, Arnadottir GA, Eiriksson O, Zink F, Helgason EA, Jonsdottir I, Gylfason A, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Beyter D, Steingrimsdottir T, Norddahl GL, Magnusson OT, Masson G, Halldorsson BV, Thorsteinsdottir U, Helgason A, Sulem P, Gudbjartsson DF, Stefansson K. Differences between germline genomes of monozygotic twins. *Nat Genet*. 2021 Jan;53(1):27-34. doi: 10.1038/s41588-020-00755-1
30. Korlević P, Gerber T, Gansauge MT, Hajdinjak M, Nagel S, Aximu-Petri A, Meyer M. Reducing microbial and human contamination in DNA extractions from ancient bones and teeth. *Biotechniques*. 2015 Aug 1;59(2):87-93. doi: 10.2144/000114320
31. Korlević P, Meyer M. Pretreatment: Removing DNA Contamination from Ancient Bones and Teeth Using Sodium Hypochlorite and Phosphate. *Methods Mol Biol*. 2019;1963:15-19. doi: 10.1007/978-1-4939-9176-1_2
32. Kuhlwilm M, Boeckx C. A catalog of single nucleotide changes distinguishing modern humans from archaic hominins. *Sci Rep*. 2019 Jun 11;9(1):8463. doi: 10.1038/s41598-019-44877-x
33. Kuluev B.R., Baymiev An.Kh., Gerashchenkov G.A., Yunusbaev U.B., Garafutdinov R.R., Alekseev Ya.I., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. One hundred years of haploid genomes. Now time comes for diploid genomes. *Biomics*. 2020. Vol. 12(4). P. 411-434. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-33 (In Russian)
34. Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP, Axelrod N, Huang J, Kirkness EF, Denisov G, Lin Y, MacDonald JR, Pang AW, Shago M, Stockwell TB, Tsiamouri A, Bafna V, Bansal V, Kravitz SA, Busam DA, Beeson KY, McIntosh TC, Remington KA, Abril JF, Gill J, Borman J, Rogers YH, Frazier ME, Scherer SW, Strausberg RL, Venter JC. The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol*. 2007 Sep 4;5(10):e254. doi: 10.1371/journal.pbio.0050254
35. Li R, Li Y, Zheng H, Luo R, Zhu H, Li Q, Qian W, Ren Y, Tian G, Li J, Zhou G, Zhu X, Wu H, Qin J, Jin X, Li D, Cao H, Hu X, Blanche H, Cann H, Zhang X, Li S, Bolund L, Kristiansen K, Yang H, Wang J, Wang J. Building the sequence map of the human pan-genome. *Nat Biotechnol*. 2010 Jan;28(1):57-63. doi: 10.1038/nbt.1596
36. Lowery RK, Uribe G, Jimenez EB, Weiss MA, Herrera KJ, Regueiro M, Herrera RJ. Neanderthal and Denisova genetic affinities with contemporary humans: introgression versus common ancestral polymorphisms. *Gene*. 2013 Nov 1;530(1):83-94. doi: 10.1016/j.gene.2013.06.005
37. Lupski J.R. Biology in balance: human diploid genome integrity, gene dosage, and genomic medicine. *Trends Genet*. 2022. V.38(6). P.554-571. doi: 10.1016/j.tig.2022.03.001
38. Mafessoni F, Grote S, de Filippo C, Slon V, Kolobova KA, Viola B, Markin SV, Chintalapati M, Peyregne S, Skov L, Skoglund P, Krivoschapkin AI, Derevianko AP, Meyer M, Kelso J, Peter B, Prufer K, Paabo S. A high-coverage Neandertal genome from Chagyrskaya Cave. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Jun 30;117(26):15132-15136. doi: 10.1073/pnas.2004944117
39. Mallick S, Li H, Lipson M, Mathieson I, Gymrek M, Racimo F, Zhao M, Chennagiri N, Nordenfelt S, Tandon A, Skoglund P, Lazaridis I, Sankararaman S, Fu Q, Rohland N, Renaud G, Erlich Y, Willems T, Gallo C, Spence JP, Song YS, Poletti G, Balloux F, van Driem G, de Knijff P, Romero IG, Jha AR, Behar DM, Bravi CM, Capelli C, Hervig T, Moreno-Estrada A, Posukh OL, Balanovska E, Balanovsky O, Karachanak-Yankova S, Sahakyan H, Toncheva D, Yepiskoposyan L, Tyler-Smith C, Xue Y, Abdullah MS, Ruiz-Linares A, Beall CM, Di Rienzo A, Jeong C, Starikovskaya EB, Metspalu E, Parik J, Vilems R, Henn BM, Hodoglugil U, Mahley R, Sajantila A, Stamatoyannopoulos G, Wee JT, Khusainova R, Khusnutdinova E, Litvinov S, Ayodo G, Comas D, Hammer MF, Kivisild T, Klitz W, Winkler CA, Labuda D, Bamshad M, Jorde LB, Tishkoff SA, Watkins WS, Metspalu M, Dryomov S, Sukernik R, Singh L, Thangaraj K, Paabo S, Kelso J, Patterson N, Reich D. The Simons Genome Diversity Project: 300 genomes from 142 diverse populations. *Nature*. 2016 Oct 13;538(7624):201-206. doi: 10.1038/nature18964
40. Meyer M, Arsuaga JL, de Filippo C, Nagel S, Aximu-Petri A, Nickel B, Martinez I, Gracia A, Bermudez de Castro JM, Carbonell E, Viola B, Kelso J, Prufer K, Paabo S. Nuclear DNA sequences from the Middle Pleistocene Sima de los Huesos hominins. *Nature*. 2016 Mar 24;531(7595):504-7. doi: 10.1038/nature17405
41. Meyer M, Kircher M, Gansauge MT, Li H, Racimo F, Mallick S, Schraiber JG, Jay F, Prufer K, de Filippo C, Sudmant PH, Alkan C, Fu Q, Do R, Rohland N, Tandon A, Siebauer M, Green RE, Bryc K, Briggs AW, Stenzel U, Dabney J, Shendure J, Kitzman J, Hammer MF, Shunkov MV, Derevianko AP, Patterson N, Andres AM, Eichler EE, Slatkin M, Reich D, Kelso J, Paabo S. A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual. *Science*. 2012 Oct 12;338(6104):222-6. doi: 10.1126/science.1224344

42. Miga KH. Chromosome-Specific Centromere Sequences Provide an Estimate of the Ancestral Chromosome 2 Fusion Event in Hominin Genomes. *J Hered.* 2017 Jan;108(1):45-52. doi: 10.1093/jhered/esw039
43. Miga KH, Wang T. The Need for a Human Pangenome Reference Sequence. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2021 Aug 31;22:81-102. doi: 10.1146/annurev-genom-120120-081921
44. Nurk S., Koren S., Rhie A. et al. The complete sequence of a human genome. *Science.* 2022. V.376(6588). P.44-53. doi: 10.1126/science.abj6987
45. Orlando L, Gilbert MT, Willerslev E. Reconstructing ancient genomes and epigenomes. *Nat Rev Genet.* 2015 Jul;16(7):395-408. doi: 10.1038/nrg3935
46. Peyregne S, Peter BM. AuthentiCT: a model of ancient DNA damage to estimate the proportion of present-day DNA contamination. *Genome Biol.* 2020 Sep 15;21(1):246. doi: 10.1186/s13059-020-02123-y
47. Poszewiecka B, Gogolewski K, Stankiewicz P, Gambin A. Revised time estimation of the ancestral human chromosome 2 fusion. *BMC Genomics.* 2022 Aug 25;23(Suppl 6):616. doi: 10.1186/s12864-022-08828-7
48. Prufer K, de Filippo C, Grote S, Mafessoni F, Korlević P, Hajdinjak M, Vernot B, Skov L, Hsieh P, Peyregne S, Reher D, Hopfe C, Nagel S, Maricic T, Fu Q, Theunert C, Rogers R, Skoglund P, Chintalapati M, Dannemann M, Nelson BJ, Key FM, Rudan P, Kučan Ž, Gušić I, Golovanova LV, Doronichev VB, Patterson N, Reich D, Eichler EE, Slatkin M, Schierup MH, Andres AM, Kelso J, Meyer M, Paabo S. A high-coverage Neandertal genome from Vindija Cave in Croatia. *Science.* 2017 Nov 3;358(6363):655-658. doi: 10.1126/science.aao1887
49. Prufer K, Racimo F, Patterson N, Jay F, Sankararaman S, Sawyer S, Heinze A, Renaud G, Sudmant PH, de Filippo C, Li H, Mallick S, Dannemann M, Fu Q, Kircher M, Kuhlwilm M, Lachmann M, Meyer M, Ongyerth M, Siebauer M, Theunert C, Tandon A, Moorjani P, Pickrell J, Mullikin JC, Vohr SH, Green RE, Hellmann I, Johnson PL, Blanche H, Cann H, Kitzman JO, Shendure J, Eichler EE, Lein ES, Bakken TE, Golovanova LV, Doronichev VB, Shunkov MV, Derevianko AP, Viola B, Slatkin M, Reich D, Kelso J, Paabo S. The complete genome sequence of a Neandertal from the Altai Mountains. *Nature.* 2014 Jan 2;505(7481):43-9. doi: 10.1038/nature12886
50. Renaud G, Hanghoj K, Willerslev E, Orlando L. gargammel: a sequence simulator for ancient DNA. *Bioinformatics.* 2017 Feb 15;33(4):577-579. doi: 10.1093/bioinformatics/btw670
51. Renaud G, Schubert M, Sawyer S, Orlando L. Authentication and Assessment of Contamination in Ancient DNA. *Methods Mol Biol.* 2019;1963:163-194. doi: 10.1007/978-1-4939-9176-1_17
52. Renaud G, Slon V, Duggan AT, Kelso J. Schmutzi: estimation of contamination and endogenous mitochondrial consensus calling for ancient DNA. *Genome Biol.* 2015 Oct 12;16:224. doi: 10.1186/s13059-015-0776-0
53. Roberts NJ, Vogelstein JT, Parmigiani G, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. The predictive capacity of personal genome sequencing. *Sci Transl Med.* 2012 May 9;4(133):133ra58. doi: 10.1126/scitranslmed.3003380
54. Rohland N, Harney E, Mallick S, Nordenfelt S, Reich D. Partial uracil-DNA-glycosylase treatment for screening of ancient DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015 Jan 19;370(1660):20130624. doi: 10.1098/rstb.2013.0624
55. Sakhabutdinova A.R., Mikhailenko K.I., Garafutdinov R.R., Kiryanova O.Yu., Sagitova M.A., Sagitov A.M., Chemeris A.V. Non-biological application of DNA molecules. *Biomics.* 2019. V.11(3). P. 344-377. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-28 (In Russian)
56. Slon V, Mafessoni F, Vernot B, de Filippo C, Grote S, Viola B, Hajdinjak M, Peyregne S, Nagel S, Brown S, Douka K, Higham T, Kozlikin MB, Shunkov MV, Derevianko AP, Kelso J, Meyer M, Prufer K, Paabo S. The genome of the offspring of a Neanderthal mother and a Denisovan father. *Nature.* 2018 Sep;561(7721):113-116. doi: 10.1038/s41586-018-0455-x
57. Soares AER. Hybridization Capture of Ancient DNA Using RNA Baits. *Methods Mol Biol.* 2019;1963:121-128. doi: 10.1007/978-1-4939-9176-1_13
58. Stankiewicz P. One pedigree we all may have come from - did Adam and Eve have the chromosome 2 fusion? *Mol Cytogenet.* 2016 Sep 26;9:72. doi: 10.1186/s13039-016-0283-3
59. Tanaka H, Kawai T. Partial sequencing of a single DNA molecule with a scanning tunnelling microscope. *Nat Nanotechnol.* 2009 Aug;4(8):518-22. doi: 10.1038/nnano.2009.155
60. Venter JC. Multiple personal genomes await. *Nature.* 2010 Apr 1;464(7289):676-7. doi: 10.1038/464676a
61. Wall JD, Kim SK. Inconsistencies in Neandertal genomic DNA sequences. *PLoS Genet.* 2007 Oct;3(10):1862-6. doi: 10.1371/journal.pgen.0030175
62. Wang T, Antonacci-Fulton L, Howe K, Lawson HA, Lucas JK, Phillippy AM, Popejoy AB, Asri M, Carson C, Chaisson MJP, Chang X, Cook-Deegan R, Felsenfeld AL, Fulton RS, Garrison EP, Garrison NA, Graves-Lindsay TA, Ji H, Kenny EE, Koenig BA, Li D, Marschall T, McMichael JF, Novak AM, Purushotham D, Schneider VA, Schultz BI, Smith MW, Sofia HJ, Weissman T, Flicek P, Li H, Miga KH, Paten B, Jarvis

- ED, Hall IM, Eichler EE, Haussler D; Human Pangenome Reference Consortium. The Human Pangenome Project: a global resource to map genomic diversity. *Nature*. 2022 Apr;604(7906):437-446. doi: 10.1038/s41586-022-04601-8
63. Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, He W, Chen YJ, Makhijani V, Roth GT, Gomes X, Tartaro K, Niazi F, Turcotte CL, Irzyk GP, Lupski JR, Chinault C, Song XZ, Liu Y, Yuan Y, Nazareth L, Qin X, Muzny DM, Margulies M, Weinstock GM, Gibbs RA, Rothberg JM. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature*. 2008 Apr 17;452(7189):872-6. doi: 10.1038/nature06884
64. Zhur KV, Trifonov VA, Prokhortchouk EB. Progress and Prospects in Epigenetic Studies of Ancient DNA. *Biochemistry (Mosc)*. 2021 Dec;86(12):1563-1571. doi: 10.1134/S0006297921120051
65. Zubov V.V., Chemeris D.A., Vasilov R.G., Kurochkin V.E., Alekseev Ya.I. Brief history of high-throughput nucleic acid sequencing methods. *Biomcs*. 2021. V.13(1). P. 27-46. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-4 (In Russian)