Mgr Magda Lewandowska
Zakład Biologii Molekularnej
Uniwersytet medyczny w Łodzi

Variation of Polish and Lithuanian gene pool over time – alleles predisposing to infectious diseases

Patogeny niewątpliwie stanowią jeden z najsilniejszych czynników napędzających dobór naturalny. Konieczność przeciwstawiania się zagrażającym życiu zakażeniom jest uważana za główny czynnik kształtujący naszą pulę genową, a zmiany w częstości alleli warunkujących odporność na poszczególne patogeny odzwierciedlają okresy presji selekcyjnej. Na poziomie DNA, mechanizm adaptacji do szkodliwych warunków środowiska jest badany głównie w oparciu o zmienność genetyczną współczesnych populacji. Jednakże, takie badania są niewrażliwe na występujące w przeszłości zjawiska demograficzne, a te często zostawiają ślady w genomie przypominające sygnały doboru. Nieustający postęp w zakresie molekularnych technik uzyskiwania i sekwencjonowania kopalnego DNA (aDNA) pozwala na bezpośredni wgląd w zmiany puli genowej w czasie. Celem niniejszej pracy była analiza częstości alleli w genach wrodzonej odpowiedzi immunologicznej związanych z podatnością na infekcje wywołane przez wewnątrzkomórkowe patogeny w historycznych populacjach, a także ocena, które siły ewolucji lub czynniki demograficzne przyczyniły się do zmian w częstości tych alleli na przestrzeni czasu.

Analizowano następujące zmiany polimorficzne w genach kodujących białka wrodzonej odpowiedzi immunologicznej: *SLC11A1* D543N, *MBL2* G161A, *TLR2* -196 -174 ins/del, *P2RX7* A1513C, *IL10* A-1082G i *TNFA* G-308A. Kopalny DNA izolowany był z materiału szkieletowego od 327 osobników ze Środkowej Europy (Polski i Litwy) z różnych stanowisk archeologicznych datowanych na I-XVIII wiek. Obecność mutacji oceniano na podstawie wyniku sekwencjonowania metodą Sangera i analizy RFLP. Uzyskiwana częstości alleli była porównywana z wynikami dotyczącymi współczesnych populacji. Ponadto, u każdego osobnika sekwencjonowano region hiperzmienny I (HVRI) genomu mitochondrialnego (mtDNA). Stosowane metody analizy biostatystycznej pozwalają rozróżnić charakter działającego czynnika ewolucyjnego pomiędzy presją selekcyjną środowiska (np. epidemii) i działaniem dryfu genetycznego, szczególnie nasilonego w przypadku populacji o małej liczebności. Szacowany był również możliwy wpływ na skład puli genowej historycznych populacji innych zjawisk demograficznych, takich jak wsobność i przepływ genów ścisłe związany z migracjami.

Aby ograniczyć możliwość zanieczyszczania prób egzogennym DNA, zachowano konieczne środki ostrożności na każdym etapie analizy (m.in. oddzielne pomieszczenia do pracy z

kopalnym materiałem genetycznym, powtarzanie izolowania i namnażania aDNA, stosowanie sterylnego sprzętu i odczynników, używanie okrycia ochronnego, kontrola obecności DNA w trakcie procedur). Sekwencję *HVRI* poszczególnych osób zaangażowanych w proces badawczy porównywano z zidentyfikowanymi w badanych populacjach, aby zweryfikować autentyczność sekwencji każdego analizowanego fragmentu oraz potwierdzić różnorodność haplotypów mtDNA, której brak pośrednio wskazuje na zanieczyszczenie badanej próby możliwe podczas prac archeologicznych lub w czasie analizy molekularnej.

Ocena struktury demograficznej populacji sugeruje wysoki poziom homozygotyczności w większości badanych subpopulacji, związanej zapewne z wsobnością będącą konsekwencją geograficznej izolacji. Pozostaje to w zgodzie z wynikami analizy genetycznego zróżnicowania populacji (F_{ST}), które sugerują, że w przeszłości populacje Polski i Litwy składały się z małych, odizolowanych grup o ograniczonym przepływie genów. Brak ciągłości genetycznej między współczesną populacją Polski i historycznymi z Cedyni i Siedlec, oraz występowanie określonych haplogrup sugeruje wpływ odległych populacji na skład ich puli genowej, co jest prawdopodobnie efektem wcześniejszych migracji związanych z handlem lub okresami wojen. Stosunkowo wysoka częstość występowania haplogrupy N1a w historycznych populacjach Litwy wskazuje na udział populacji neolitycznych w kształtowaniu obserwowanej zmienności genetycznej, co potwierdza teorię o migrowaniu pierwszych rolników na obszarze Środkowej Europy.

Analiza zmiany częstości alleli wraz z upływem czasu wykazała, że w przypadku czterech alleli (genów *MBL2*, *TLR2*, *P2RX7* i *TNFA*) głównym czynnikiem ewolucyjnym na nie działającym był dryf genetyczny, podczas gdy dwa allele mogły pozostawać mogły pod wpływem doboru oczyszczającego (*SLC11A1*, s = 0,035 – 0,071) oraz stabilizującego (*IL10*, s = 0,018). Należy podkreślić, że pozostałe mutacje mogły również podlegać doborowi naturalnemu, przy czym złożony charakter procesu adaptacji mógł pozostać niezauważony ze względu na małą liczebność badanych grup i nakładający się efekt wsobności. Obie mutacje, dla których wykryto sygnał doboru naturalnego są zlokalizowane w genach kodujących współdziałające białka w molekularnym mechanizmie rozwoju gruźlicy, co dodatkowo wzmacnia hipotezę o możliwości ich selekcji pod wpływem obecności prątków. Wartość oznaczonych współczynników doboru jest stosunkowo wysoka w porównaniu z innymi badaniami, w których stosowano tego samego typu symulacje, Jest to prawdopodobnie związane z okresem, z którego pochodzą badane próby. Analiza zmian częstości alleli w starszym materiale - choć trudna metodycznie - pozwoli niewątpliwie dokładniej oszacować siłę doboru naturalnego działającego na allele w genach *SLC11A1* i *IL-10* oraz na inne mutacje warunkujące wrażliwość na choroby zakaźne.

Magda Lewandowska

03.02.2017