

STRESZCZENIE

Proces ewolucji, znaczonej zmianami częstości występowania alleli w kolejnych pokoleniach, jest napędzany czynnikami doboru naturalnego i dryfem genetycznym. Istotą *doboru naturalnego* jest jego kierunkowość powodowana działaniem czynników, wpływających na zmianę częstości alleli kodujących białka zaangażowane w procesach dostosowujących populację do warunków środowiskowych. *Dryf* natomiast jest procesem stochastycznym, ograniczonym wyłącznie wielkością populacji w której zachodzi.

Przyjmuje się, że patogeny stanowią jeden z najsilniej oddziałujących czynników doboru naturalnego, które kształtują skład puli genowej ludzkich populacji modyfikując częstość występowania alleli chroniących i predysponujących do infekcji. Współczesne techniki namnażania i sekwencjonowania cząsteczek DNA izolowanych z materiału kopalnego umożliwiają analizę składu pul genowych populacji z różnych okresów czasu dostarczając informacji o zjawiskach demograficznych, tworzących obraz przypominających często dobór naturalny.

Przedmiotem pracy jest analiza profilu zmian częstości alleli związanych z wrodzoną odpowiedzią immunologiczną w 16 populacjach historycznych, a także próba oceny mechanizmu ich powstawania oraz ocena zjawisk demograficznych, wpływających na zmienność w czasie.

Analizowano trzy miejsca polimorficzne w genach *CCR5*, *CCR2-64I* i *SDF 1* związanych z wrodzoną odpowiedzią immunologiczną, istotną w różnego rodzaju infekcjach, chorobach autoimmunologicznych i nowotworach. W ramach badań przeanalizowano materiał kostny 681 osobników z 39 stanowisk archeologicznych zlokalizowanych na obszarze współczesnej Polski i Litwy, datowanych w przedziale pomiędzy XL w.p.n.e. i XIX w.n.e. Częstość alleli, identyfikowanych w materiale kopalnym metodą Sanger, porównywano z danymi opisującymi populacje współczesne. Autentyczność analizowanych sekwencji i ciągłość genetyczną pomiędzy populacjami oceniano na podstawie analizy składu haplogrup mtDNA, identyfikowanych na podstawie sekwencji HVRI. Do oceny uzyskanych danych zastosowano zaawansowaną analizę biostatystyczną, która na podstawie częstości alleli pozwala sugerować mechanizm odpowiedzialny za zmiany pomiędzy pokoleniami. Podjęto także próbę oceny występujących zjawisk demograficznych, a tym chowu wsobnego i przepływu genów, które mogły przyczynić się do zmiany składu pul genowych badanych populacji.



Analizę kopalnego DNA przeprowadzono z zachowaniem rygorów przypisanych procesowi analizy kopalnych cząsteczek. Stosowano szereg procedur, w tym wielokrotne izolowanie i namnażanie DNA z materiału kostnego przeprowadzono w pomieszczeniach przeznaczonych do tego celu (*clean room*). Stosowano odzież ochronną, sterylne, jednorazowy sprzęt i monitorowano możliwość zanieczyszczenia cząsteczkami egzogennymi odczynników stosowanych na każdym z etapów procedury. Haplogrupę zidentyfikowaną w materiale kopalnym porównywano z profilem haplogrupowym osób biorących udział w procesie izolowania i analizy DNA.

Wyniki uzyskane na podstawie lokalnego współczynnika wsobności populacji potwierdzają znaczący udział homozygot w większości analizowanych populacji, co sugeruje występowanie zjawiska izolacji i chowu wsobnego biorących udział w kształtowaniu ich puli genowej. Dane opisujące częstość alleli jądrowych pozostają w zgodzie z genetycznym zróżnicowaniem populacji ocenianym na podstawie sekwencji HVRI mtDNA, potwierdzającym występowania historycznych populacji Polski i Litwy w postaci małych, izolowanych grup.

Wynik analizy biostatystycznej sugeruje, że dryf genetyczny był czynnikiem powodującym fluktuację częstości allelu *CCR5Δ32* w czasie, w przeciwieństwie do alleli *CCR2-64I* i *SDF 1-3'A* na których częstość miał wpływ dobór negatywny.

Produkty białkowe analizowanych genów związane z wrodzoną odpowiedzią immunologiczną, w tym pośrednio z procesem infekcji HPV, prowadzą często do rozwoju raka szyjki macicy. Wirus brodawczaka ludzkiego jest potencjalnym czynnikiem doboru naturalnego kontrolującego częstość alleli *CCR2-64I* i *SDF 1-3'A*. Choć udokumentowano rolę allelu *CCR5Δ32* w molekularnym mechanizmie odpowiedzi na infekcję HPV, to jednak przeprowadzona analiza nie potwierdziła działania doboru naturalnego. Mała liczebność próby badanej i nakładający się efekt wsobności lub inne niezidentyfikowane czynniki doboru mogły mieć wpływ na uzyskane dane.

Przedstawiona praca, po raz pierwszy porusza temat czynników ewolucyjnych powodujących międzypokoleniową zmianę częstości *CCR5Δ32*, *CCR2-64I* i *SDF 1-3'A* i wskazuje na HPV, jako czynnik doboru działający na miejsca polimorficzne w genach *CCR2* i *SDF 1*.

Badania stanowiące przedmiot pracy doktorskiej były w części finansowane w ramach zadania badawczego nr 502-04-037 Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.



SUMMARY

The process of evolution, marked by changes in allele occurrence frequency in consecutive generations, is driven by natural selection factors and genetic drift. The essence of *natural selection* is its directionality caused by the factors that influence the change of the occurrence frequency of alleles that code for proteins involved in processes aimed at adapting a population to environmental conditions. Drift, in turn, is a stochastic process limited solely by the size of the population in which it occurs.

It is generally accepted that pathogens constitute one of the most influential natural selection factors, which shape the composition of human gene pools by modifying the occurrence frequency of alleles responsible for protection from infection and susceptibility to it. Contemporary techniques of proliferation and sequencing of DNA fragments isolated from fossil material allow to analyse the content of gene pools of populations from disparate time periods, which delivers information about demographic phenomena that form an image oftentimes resembling natural selection.

The subject of this paper is the analysis of the profile of the changes in the frequency of alleles connected to innate immune response in 16 historic populations, as well as an attempt to investigate the mechanism of their formation and evaluation of demographic phenomena that influence variability in time.

Three polymorphic sites underwent analysis in genes *CCR5*, *CCR2-64I* and *SDF 1* connected with innate immune response, relevant in various infections, autoimmune diseases, and tumours. The study involved an analysis of bone material from 681 specimens and 39 archaeological dig sites located in the area of contemporary Poland and Lithuania dated to between 40th century BCE and 19th century CE. The allele frequency, identified in the fossil material with the use of the Sanger method, was compared with data describing contemporary populations. The authenticity of the studied sequences and genetic continuity between populations were assessed on the basis of the analysis of the composition of the mtDNA haplogroups identified by HVRI sequences. To examine the obtained data, advanced biostatistical analysis was performed, which, based on the allele frequency, allows to stipulate the mechanism responsible for generational changes. An attempt was also made to assess the occurring demographic phenomena, including inbreeding and gene flow, which could have contributed to the changes in the content of the gene pools of the studied populations.



The analysis of fossil DNA was carried out with adherence to restrictions ascribed to the process of fossil particles. A number of procedures were implemented, including multiple DNA isolation and proliferation from osseous fossil material performed in specially designated space (*clean room*). Protective clothing, sterile disposable equipment was used, the possibility of contamination of the reagents used at each step of the procedure with exogenous material was also monitored. A haplogroup identified in the fossil material was compared with the haplogroup profile of the people involved in the process of DNA isolation and analysis.

The results obtained based on the local coefficient of inbreeding in the population confirm the predominant contribution of homozygotes in the majority of the analysed populations, which suggests the existence of the phenomenon of isolation and inbreeding as a factor contributing to the shaping of their gene pools. The data describing the frequency of nuclear alleles are concordant with the genetic diversity of the populations assessed by mtDNA HVRI sequences confirming the existence of historic populations of Poland and Lithuania as small, isolated groups.

The result of the biostatistical analysis suggests that genetic drift was the factor that caused the fluctuation of the *CCR5Δ32* allele frequency over time, in contrast to the *CCR2-64I* and *SDF 1-3'A* alleles, the fluctuations of which were affected by negative selection.

The protein products of the analysed genes connected with the innate immune response, including, indirectly, with the process of HPV infection, often lead to the development of cervical cancer. The human papilloma virus is the potential selective factor controlling the frequency of the *CCR2-64I* and *SDF 1-3'A* alleles. Although the role of the *CCR5Δ32* was documented in the molecular mechanism of the response to an HPV infection, the conducted analysis has not confirmed the action of natural selection. The limited abundance of the studied sample and the overlapping inbreeding effect as well as other unidentified selective factors could have influenced the obtained results.

The presented work has, for the first time, approached the topic of evolutionary factors that cause intergenerational change in the frequency of the *CCR5Δ32*, *CCR2-64I* and *SDF 1-3'A* alleles and points towards HPV as the selective factor affecting the polymorphic sites in *CCR2* and *SDF 1* genes.

The studies that constitute the basis for the doctoral dissertation were partly financed within the research task no. 502-04-037 Medical University of Lodz.

