

**dr inż. Anna Juras**

Pracuje w Instytucie
Biologii i Ewolucji
Człowieka na Wydziale
Biologii Uniwersytetu
im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu jako
adiunkta.
Z wykształcenia
biotechnolożka
i antropolożka. Zajmuje
się badaniami
kopalnego ludzkiego
DNA. Interesuje się
pochodzeniem
populacji historycznych
i pradziejowych
z Europy Centralnej oraz
ich migracjami
w okresie od neolitu
do średniowiecza.
anna.juras@amu.edu.pl

HISTORIA ZAPISANA W KOŚCIACH



Badacze w laboratorium
kopalnego DNA na Wydziale
Biologii UAM

Uzyskanie z kopalnych ludzkich szczątków materiału genetycznego do badań jest trudne głównie z powodu zanieczyszczenia próbek.

**Anna Juras
Maciej Chyleński**

Instytut Biologii i Ewolucji Człowieka
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Kwas deoksyrybonukleinowy, czyli DNA, występuje w komórkach wszystkich żyjących organizmów. Jest on polimerem składającym się z czterech rodzajów podjednostek zwanych nukleotydami: tyminy (T), cytozyny (C), guaniny (G) i adeniny (A), za pomocą których jest zakodowana informacja przechowywana w DNA. Jest on także obecny po śmierci w szczątkach kostnych i wówczas nazywamy go kopalnym DNA (z angielskiego *ancient DNA* – aDNA). W przeciwieństwie do materiału genetycznego pochodzącego z żywych organizmów aDNA jest silnie pofragmentowany i posiada charakterystyczne zmiany w swojej strukturze, które powstają w wyniku procesów depozycyjnych i postdepozycyjnych zachodzących po śmierci (*post-mortem*) organizmu. W pierwszej fazie DNA ulega fragmentacji pod wpływem enzymów tnących kwasy nukleinowe (w tym DNA), czyli tzw. endogennych nukleaz, które zostają uwolnione w wyniku śmierci komórkowej. Następnie DNA jest degradowany przez mikroorganizmy (głównie bakterie). W dalszej kolejności, wraz z upływem czasu, DNA ulega degradacji na skutek działania czynników środowiska, w tym wody, temperatury, tlenu czy promieniowania UV. Przykładowo pod wpływem wody może dochodzić do tzw. depurynacji hydrolitycznej, czyli przecinania DNA w miejscach, gdzie występują puryny, tj. G i A, lub do tzw. deaminacji nukleotydów. To drugie zjawisko najczęściej prowadzi do zamiany C w uracyl, czyli nukleotyd, który jest później interpretowany jako T. Dlatego ostatecznie w wyniku tych przemian na końcach fragmentów aDNA zamiast C występuje T, a na nici komplementarnej w miejscu G pojawia się A. Mutacje te następują stopniowo i są typowe dla aDNA. Dotyczą one głównie 10 ostatnich nukleotydów każdego fragmentu DNA.

Czas, który upłynął od momentu depozycji do pobrania próby do badań molekularnych, jest niewąt-

pliwie czynnikiem limitującym, choć to głównie środowisko, w którym zostały zdeponowane materiały kostne, ostatecznie decyduje o stanie zachowania aDNA. Co ciekawe, już po blisko 150 latach średnia długość fragmentów aDNA wynosi zaledwie około 40 do 80 par zasad. Powyższe cechy oraz fakt, że materiał kostny jest podatny na zanieczyszczenia współczesnym, egzogennym DNA, powoduje, że praca z kopalnym materiałem genetycznym jest jedną z najbardziej wymagających.

Zanieczyszczenia materiałów

Zanieczyszczenia współczesnym DNA były do niedawna – z uwagi na brak dobrych narzędzi do jego detekcji – przeszkodą w badaniach aDNA. Za najgroźniejsze uważa się zanieczyszczenie szczątków ludzkich przez DNA badaczy tych materiałów, począwszy od archeologów, przez antropologów fizycznych i muzealników, a na pracownikach laboratoriów kopalnego DNA skończywszy. Bezpośrednim źródłem zanieczyszczenia mogą być włosy,

Największe zagrożenie wiąże się z zanieczyszczeniami współczesnymi produktami już namnożonego DNA w laboratorium.

fragmenty naskórka, drobiny potu oraz oddech osób mających styczność z próbkami. Dlatego początkowe etapy pracy z materiałami kostnymi, w tym pobieranie próbek, powinno być wykonywane z zastosowaniem określonych środków ostrożności, które obejmują konieczność użycia kombinezonów, masek i jednorazowych rękawic oraz sterylnych narzędzi, np. do cięcia kości. Pobrane próby powinny być przechowywane w stanie zamrożenia, tak by zatrzymać dalszą degradację aDNA. Zanieczyszczenia współczesnym DNA są o tyle groźne, że metody amplifikacji materiału genetycznego (niezbędne do jego analizy i odczytania) mogą w preferencyjny sposób namnażać właśnie



dr Maciej Chyleński

Archeolog i genetyk, pracuje w Instytucie Biologii i Ewolucji Człowieka na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Specjalizuje się w badaniach kopalnego DNA, a jego zainteresowania badawcze skupiają się głównie na rekonstrukcji struktury pokrewieństwa populacji pradziejowych oraz jej związków z procesami migracji. Zajmuje się również bioinformatycznymi analizami kopalnych genomów jądrowych, otrzymywanych w wyniku sekwencjonowania wysokoprzepustowego. maciej.ch@amu.edu.pl

tego typu materiał genetyczny. Największe zagrożenie wiąże się jednak z zanieczyszczeniami współczesnymi produktami już namnożonego DNA w laboratorium. Powstające w wyniku tzw. reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) stężenia DNA są nieporównywalnie większe niż ilości aDNA w badanych materiałach. Szacuje się, że jedna kropla aerozolu powstająca w wyniku otwarcia próbki zawierającej namnożony DNA może zawierać go więcej niż cały izolat aDNA. Dlatego też izolację kopalnego materiału genetycznego powinno się przeprowadzać w specjalnych laboratoriach zwanych czystymi, które muszą być fizycznie odseparowane od miejsc zwanych współczesnymi laboratoriami, w których pracuje się z namnożonym DNA. Separacja taka powinna polegać na lokalizacji

Dzięki szybkiemu rozwojowi technologii sekwencjonowania wysokoprzepustowego wzrasta ilość generowanych danych.

Pobieranie materiałów
kostnych do badań
kopalnego DNA

obu typów laboratoriów w innych budynkach (lub przynajmniej oddzielnych skrzydłach budynku) oraz instalacji osobnego, filtrowanego obiegu powietrza, wytwarzającego nadciśnienie w czystym laboratorium. Ponadto jest wymagane noszenie ubrań ochronnych, w tym pełnych kombinezonów, masek, środków ochrony oczu, podwójnych rękawic. Sama pracownia

aDNA powinna posiadać pomieszczenie zwane służące do przebierania się w strój ochronny. W trakcie pracy regularnie powinna być wykonywana dekontaminacja wszystkich powierzchni, sprzętów i narzędzi zarówno przez zastosowanie środków niszczących DNA, jak i naświetlania lampami wytwarzającymi promieniowanie UVC. Posiadanie sterylnej pracowni oraz przestrzeganie określonych procedur pracy pozwala na maksymalne zminimalizowanie ryzyka zanieczyszczenia materiałów kostnych współczesnym ludzkim DNA, a także na unikanie tzw. krzyżowych zanieczyszczeń między badanymi próbkami kostnymi.

Kolejnym typem zanieczyszczeń, z którymi spotykamy się w trakcie badań aDNA, są tzw. zanieczyszczenia środowiskowe i są one bezpośrednio związane z degradującą działalnością mikroorganizmów i ich wszechobecnym DNA. Próby kostne zwykle są mocno zanieczyszczone materiałem genetycznym pochodzenia bakteryjnego. Frakcja takiego materiału często stanowi ponad 90 proc. całkowitego izolatu DNA. Procedury stosowane w czystym laboratorium pozwalają na częściowe oczyszczenie prób z zanieczyszczeń środowiskowych znajdujących się na powierzchni materiałów kostnych, jednak ich całkowita eliminacja nie jest możliwa.

Weryfikacja autentyczności

Wszystkie kroki, które podejmujemy, pracując z kopalnym DNA, mają na celu uzyskanie izolatów DNA o najwyższej z punktu widzenia badań aDNA jakości. Oznacza to dążenie do uzyskania izolatów zawierających jak najmniejszy stosunek DNA środowiskowego do endogennego oraz ograniczanie ryzyka kontaminacji współczesnym DNA. W przypadku badania ludzkich szczątków odróżnienie fragmentów ludzkiego aDNA od materiału genetycznego bakterii nie przysparza trudności metodycznych, ale wymaga nakładu pracy i środków finansowych. Przyjmuje się, że do jakichkolwiek analiz nadają się materiały kostne zawierające przynajmniej 1 proc. endogennego ludzkiego DNA. Oznacza to, że w przypadku takich prób 99 proc. generowanych danych jest traktowane jako zanieczyszczenie środowiskowe.

Nieco więcej problemów może przysparzać weryfikacja autentyczności sekwencji aDNA i tym samym określenie poziomu ewentualnych zanieczyszczeń w postaci ludzkiego współczesnego DNA. Mimo to dysponujemy obecnie metodami i odpowiednimi narzędziami statystycznymi, które pozwalają na potwierdzenie faktu, że uzyskaliśmy autentyczny endogeny DNA. Sekwencjonowanie wysokoprzepustowe dostarcza nam sekwencji całych fragmentów DNA. Takie sekwencje zawierają w sobie dodatkowe informacje przydatne w wykrywaniu zanieczyszczeń. Ze względu na dużą ilość danych można te infor-





macje skwantyfikować i opracować statystycznie. Korzysta się w tym przypadku z cech typowych dla aDNA, a zatem mutacji *post-mortem*, w tym zmian C na T i G na A. Odpowiednio wysoka frakcja sekwencji posiadających tego typu zmiany świadczy o obecności aDNA. Ponadto analizujemy rozkład długości fragmentów DNA, który w przypadku kopalnego materiału genetycznego powinien pokazać przewagę fragmentów krótkich i bardzo krótkich. Poza tym liczba sekwencji, którą dysponujemy, umożliwia oszacowanie stopnia kontaminacji dzięki przyjrzeniu się sekwencjom zmapowanym do haploidalnych części badanych genomów, czyli takich, które powinny występować w jednym identycznym i niezmiennym wariancie u danej osoby. U ludzi takimi fragmentami genomu są mitochondrialny DNA oraz chromosomy X i Y (w przypadku osobników płci męskiej). Wszystkie niezgodności w sekwencjach pochodzących z tych części genomu mogą świadczyć o ich pochodzeniu od więcej niż jednej osoby, a więc zanieczyszczeniu izolatu DNA.

Rozwój badań

Badania aDNA (określane mianem archeogenetyki, paleogenetyki lub archeologii biomolekularnej) są jedną z najprężniej rozwijających się gałęzi bioarcheologii. Dzięki szybkiemu rozwojowi technologii sekwencjonowania wysokoprzepustowego wzrasta ilość generowanych danych, które możemy wykorzystywać w badaniach DNA. W konsekwencji w ciągu ostat-

niej dekady przeszliśmy od badania fragmentów pojedynczych genomów mitochondrialnych do badania pełnych genomów jądrowych setek osobników. Ilość generowanych danych pozwala też w jednoznaczny sposób określić autentyczność otrzymanych wyników, co przy użyciu starszej metodyki, opierającej się na bezpośrednim namnażaniu tylko wybranych fragmentów DNA, nie było możliwe. Przyrastająca ilość danych i spadające koszty sekwencjonowania pozwalają na analizy w coraz lepszej rozdzielczości. Badania ludzkiego aDNA dotyczą przede wszystkim populacji historycznych i pradziejowych głównie w kontekście ich pochodzenia, migracji czy rekonstrukcji pokrewieństwa biologicznego. Wszystkie jednak badania są zawsze wynikiem zmagania z zanieczyszczeniem zarówno DNA środowiskowym, jak i ludzkim, z czego – pobeżnie czytając wyniki takich analiz – nie zawsze zdajemy sobie sprawę. Przykładowo w projekcie dotyczącym badań populacji z epoki brązu, zamieszkujących tereny dzisiejszej Polski i Ukrainy 4200–3200 lat temu, ze 175 przebadanych izolatów DNA w 82 był obecny wysoki stopień zanieczyszczenia DNA środowiskowym, co wykluczyło je z dalszych analiz. Z kolei dwie próby musiały zostać wyłączone z badań z powodu zanieczyszczenia współczesnym ludzkim DNA. Ostatecznie jedynie kopalne genomy jądrowe 91 osób mogły zostać poddane dalszym analizom, co okazało się ilością wystarczającą do wykazania, że na przełomie wczesnej i środkowej epoki brązu (około 3800 lat temu) miała miejsce migracja, która w sposób istotny zmieniła europejską pulę genów. ■

Zęby i części skaliste kości skroniowych – najczęściej wykorzystywane materiały do izolacji kopalnego DNA

Chcesz wiedzieć więcej?

Chyleński M., Makarowicz P., Juras A. et al., *Patrilocality and hunter-gatherer-related ancestry of populations in East-Central Europe during the Middle Bronze Age*, „Nature Communications” 14/2023, doi: 10.1038/s41467-023-40072-9