

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на соискание степени доктора философии (Ph.D) по специальности «6D010700 – Биотехнология»

МУСРАЛИНА ЛЯЗЗАТ ЗЕНУРАИНОВНА

Палеогенетический анализ патогенных микроорганизмов в археологических находках с территории Казахстана

Общая характеристика работы. Диссертационная работа относится к области палеогенетики. Она посвящена анализу древних патогенных организмов в костном материале человека, представляющем археологические находки с территории Центрально-Евразийской степи. В работе представлены данные по сбору археологических материалов с территории современного Казахстана, России и Кыргызстана, данные по выделению палео-ДНК, приготовлению библиотек, полногеномному секвенированию палео-ДНК (360 древних индивидов), биоинформатическому скринингу на наличие ДНК широкого спектра патогенных микроорганизмов и некоторых ДНК-содержащих вирусов, оценке их копийности и древности. Для обнаруженных штаммов чумной палочки *Yersinia pestis* в работе применялись биотехнологические подходы реконструкции древних геномов на основе данных полногеномного секвенирования древних индивидов и qPCR-основанной специфической идентификации *pla* гена активатора плазминогена. Для древних штаммов *Yersinia pestis* и *HBV* был проведен филогенетический анализ и суммированы все последние достижения по анализу ДНК древних штаммов в эволюционном, медицинском, экологическом и историческом контексте.

Актуальность темы исследования. В последние годы возможности палеогенетики существенно расширились благодаря развитию биотехнологий, совершенствованию методов работы с древними биоматериалами, разработке новых методов анализа ДНК, развитию современных технологий биоинформационного анализа и накоплению данных о последовательностях древних ДНК человека, животных и низших организмов. Разработка биотехнологических методов анализа, позволяющих не только выявлять различия между древними и современными ДНК на основе дегградации и химической модификации древних ДНК, но и успешно проводить реконструкции древних геномов, стала основой для создания специфических пакетов программного обеспечения, без которых сейчас практически невозможен анализ древних геномов. Однако стоит отметить, что в виду сложности анализа древних ДНК, количество лабораторий палео-ДНК по всему миру все еще остается весьма ограниченным, среди них очень мало лабораторий, работающих с древними патогенными микроорганизмами. Анализ древних патогенов требует удостовериться в том, что идентифицированный в древнем костном материале агент не является результатом контаминации. Верификация положительного результата требует подтверждения несколькими методами анализа.

Помимо исторического аспекта, исследования древних патогенов актуальны и с точки зрения современной медицины. Последовательности человеческих штаммов опасных вирусов и бактерий, выделенные из разных географических мест и в разные периоды времени, позволяют применить подходы филогенетического анализа, провести географическое и молекулярное датирование, получить информацию о распространении инфекций.

Настоящая работа имеет особую актуальность в связи с тем, что археологический материал из Центрально-Евразийского пространства, включая территорию современного Казахстана, практически не был изучен в контексте древних возбудителей заболеваний и миграционной истории особо опасных инфекций.

Цель исследования. Целью настоящей работы явился палеогенетический анализ ДНК человека из могильников Центрально-Евразийского региона на наличие древних штаммов патогенных микроорганизмов и вирусов.

Задачи исследования

1. Анализ археологических находок ранних периодов истории Центрально-Евразийского региона и сбор материалов для исследования, представляющих древние костные останки людей.

2. Выделение и анализ образцов палео-ДНК. Подготовка ДНК-библиотек и проведение высокопроизводительного секвенирования.

3. Биоинформационный скрининг данных NGS на известные возбудители заболеваний человека, включая возбудителей чумы, туберкулеза, воспалительных и желудочно-кишечных заболеваний.

4. Верификация результатов биоинформационного скрининга в отношении значимых патогенных организмов.

5. Реконструкция геномов и филогенетический анализ наиболее значимых древних штаммов возбудителей заболеваний человека в контексте мировых данных о геномах древних и современных патогенов.

6. Анализ связей между миграционной историей человеческих популяций обнаруженными патогенами.

Объекты исследования и материалы. Объектами исследования были образцы костных тканей и зубов 360 древних индивидов, датированных с VII века до н.э. по XIV век н.э., из них 205 с территории современного Казахстана, 120 - из Кыргызстана, 35 - из России.

Методы исследования. В диссертационной работе использован комплекс современных методов палеогенетического анализа костных останков человека, акцентированный на геномах древних возбудителей заболеваний. Все манипуляции, связанные с предобработкой и выделением ДНК из археологического материала, проведены в специализированной лаборатории для палеогенетических работ с применением всех возможных мер для защиты от контаминации древних ДНК современными ДНК. NGS секвенирование библиотек палео-ДНК проведено на платформах Illumina (HiSeq 4000 / MiSeq). Биоинформационная обработка первичных NGS данных и скрининг на известные возбудители болезней проведены с использованием специализированных для анализа древних ДНК пакетов программ EAGER и HOPS. Наличие древних штаммов возбудителей чумы в образцах палео-ДНК человека устанавливали как с помощью метода реал-тайм ПЦР с использованием специфических праймеров к референсной ДНК *Yersinia pestis*, так и методами биоинформационного анализа данных NGS. Верификацию результатов биоинформационного скрининга проводили методом захвата (Capture) референсных ДНК с использованием мировых баз данных по патогенам. Автоматическую реконструкцию древних геномов патогенов и филогенети-

ческий анализ значимых патогенных организмов проводили с учетом всех известных мировых палеогенетических и современных данных с использованием пакетов программ MEGAN, VCF, BEAST, R-Studio.

Научная новизна исследования. В данной работе впервые в мире проведен анализ древних возбудителей заболеваний на археологическом материале, представляющем костные останки человека из могильников с территории современного Казахстана и прилегающих районов Кыргызстана и России. Такой большой массив данных (360 древних индивидов) с территории Центрально-Евразийской степи изучен впервые. В отношении этих древних возбудителей опасных инфекций были суммированы все последние достижения по анализу ДНК древних и современных штаммов *Yersinia pestis* и HBV в эволюционном, медицинском и экологическом контексте.

Так, впервые, в сотрудничестве с большой группой ученых всего мира, установлена эволюционная история HBV на основе изучения всех известных на сегодняшний день данных по идентифицированным у древних людей (137 объектов) штаммам HBV, датированных периодом от ~10 500 до ~400 лет назад. Результаты исследования показывают пути распространения и сдвиги в вирусном разнообразии, которые отражают известные исторические миграции людей и демографические события, а также связи с современностью. При этом казахстанские древние штаммы показали принадлежность к генотипу D, что определяет родственность циркулирующим в Евразии современным штаммам HBV.

Новизну исследования представляет также обнаружение древнего штамма *Yersinia pestis* железного века в образце из некрополя Кызыл и средневековых штаммов *Yersinia pestis* в 3 образцах несторианского кладбища Кара-Джигач, которые являются генетическими предшественниками второй эпидемии чумы («Черная смерть») в Европе.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что до сегодняшнего дня не проводились работы, связанные с изучением древних инфекционных заболеваний, циркулирующих на территории Казахстана.

Теоретическая значимость работы заключается в использовании мирового опыта современных палеогенетических методов анализа, в широком международном сотрудничестве для получения детальных сведений и комплексного анализа геномов древних патогенных микроорганизмов и вирусов, их филогении и связи с историческими событиями. Комбинируя результаты генетических исследований древних патогенов с данными из других дисциплин, таких как археология, история и палеопатология, а также генетика человеческих популяций получили возможность построить более полную картину взаимоотношений между людьми и патогенами, и современных инфекционных заболеваний, проследить пути древних миграций и восполнить пробелы в аспектах человеческой истории.

Практическая значимость диссертационной работы. В ходе исследований были установлены наиболее эффективные методы анализа древних патогенов, которые имеют методологическое значение. Имеющие междисциплинарный характер результаты исследования представляют интерес для специалистов смежных наук (медиков, антропологов, археологов, демографов и историков). Результаты работ имеют широкую образовательную ценность, будут применяться в учебном процессе при подготовке курсов лекций и семинаров для студентов

биологических, медицинских, исторических специальностей, для разработки курсов повышения квалификации, а также будут использованы в популяризации науки. Результаты исследования включены в учебный план дисциплины «МКВ 5206» Engineering Molecular Cell Biology по специальности «7М05115- Биомедицинская инженерия» КазНУ им. Аль-Фараби.

Основные положения к защите:

1. Создана пригодная для анализа геномов древних патогенов и древних людей коллекция костных останков, библиотек палео-ДНК, данных полногеномного секвенирования, представляющая 360 древних индивидов, датированных от VII века до н.э. по XIV век н.э. с территории современного Казахстана (205 образцов), Кыргызстана (120 образцов) и России (35 образцов).

2. Самыми распространенными патогенами древнего мира Центрально-Евразийской степи эпохи бронзы и железного века были микроорганизмы, вызывающие кариес, заболевания десен и других мягких тканей ротовой полости (*Treponema denticola*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Tannerella forsythia*, *Veillonella parvula* и др.). Передаваемые животными паразитарные заболевания, такие как гельминтоз, сальмонеллез, брюшной тиф отмечены у отдельных индивидов, представляющих разные некрополи. Частыми были случаи венерических заболеваний. Такие опасные заболевания, как гепатит В (HBV), чума (*Yersinia pestis*), сальмонеллез (*Salmonella enterica*) отмечены только у единичных индивидов.

3. Древние штаммы вируса гепатита В с территории Казахстана (3 индивида пазырыкской и хунно-ксяньбийской культур из некрополя Берел и 1 образец тасмолинской культуры из некрополя Акбеит) характеризуются генотипом D, что определяет родственность циркулирующим в Евразии современным штаммам HBV (A и D генотипы).

4. Распространение и эволюция *Yersinia pestis* в Центральной Евразии и Европе в эпоху от позднего неолита до раннежелезного века (LNBA) осуществлялось параллельными путями. Об этом свидетельствует общее происхождение LNBA линий и наличие предкового, менее инфекционного варианта *pla* гена. Некоторые древние линии, в том числе образец из некрополя Кызыл, в результате протяженных делеций и псевдогенизации лишены генов, ответственных за вирулентность (ген адгезии *yarC*), уклонение от иммунной системы хозяина (гены флагеллинов *flgB* и *fliZ*) и эффективную трансмиссию чумной палочки от блох (гены *ymt* и *YPM1*). При этом наиболее обширная делеция (~83 kb), включающая потерю генов системы секреции типа VI (T6SS), в частности T6SS-G, характеризует штамм *Y. pestis* из некрополя Кызыл, что связано с ослаблением его вирулентности.

5. Средневековые штаммы *Yersinia pestis* из несторианских кладбищ Кара-Джигач и Бурана (Кыргызстан) являются генетическими предшественниками второй эпидемии чумы («Черная смерть») в Европе. Филогения определяет эти штаммы, как предковую форму для опубликованных геномов Второй пандемии чумы, отделяя его одним SNP от изолята начала пандемии из Поволжья, и двумя SNP от изолятов, связанных с Черной смертью, из Западной Европы.

6. Носительство множественных и значимых патогенов у представителей различных культур и разных периодов с Восточного Казахстана, а также анализ

главных компонент генома популяций человека, указывает на особое значение Горного Алтая как перекрестка миграционных путей, определяя богатство детерминированных во времени миграций древнего населения с Востока и Запада в Центрально-Евразийский регион и социально-экономических связей.

Связь исследования с научным проектом. Диссертационная работа частично связана с проектом «Анализ знаковых феноменов, представляющих раннюю историю Великой степи, для решения вопросов этногенеза казахов» (2018-2020 гг.) и проектом на 2020-2022 годы по теме «Палеогенетический анализ патогенных микроорганизмов в археологических останках человека, представляющих Центрально-Евразийский регион», и грантом «Анализ древних геномов *Salmonella enterica* из человеческих останков с территории Центральной Азии».

Личный вклад автора. Работа с литературными данными по теме диссертации; сбор информации по археологическим материалам; работа с каталогом от музея НИИ МГУ имени М.В.Ломоносова для отбора необходимых образцов; общение с археологами; сбор археологических образцов; вся лабораторная часть: подготовка образцов, приготовление костной стружки, приготовление растворов для выделения ДНК, выделение палеоДНК, тест на ингибирование, скрининг на наличие *pla* гена *Y.pestis* методом реал-тайм ПЦР, подготовка библиотек для полногеномного секвенирования, расчет концентраций и подготовка пуллов для полногеномного секвенирования на оборудовании Illumina, подготовка к усилению для подтверждения древнего патогенного микроорганизма. Биоинформатический скрининг патогенных микроорганизмов в полученных образцах палео-ДНК. Поиск и уточнение археологических характеристик по собранным образцам. Внедрение информации по образцам в базу данных PANDORA. Подготовка акта внедрения, тезисов, статей и материалов диссертации.

Апробации исследования. Основные результаты и наблюдения представлены и подтверждены публикациями в престижных международных научных журналах, включенных в базу данных Scopus, Web of Science, журналах, рекомендованных ККСОН. Результаты обсуждались на научных семинарах института, докладывались на международных и республиканских научных конференциях.

Публикации. Основные результаты проведенных исследований по теме диссертации опубликованы в 9 научных работах, из них 4 статьи в международных рецензируемых журналах, входящие в базу данных Thomson Reuters и Scopus с импакт-факторами (IF = 14,136; IF = 41,846, IF = 11.205, IF=49.962) и 3 статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК, 2 тезиса в республиканских и международных конференциях проведенных в Казахстане и за рубежом.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 116 страницах и состоит из обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения и списка использованных источников из 184 наименований, из них 176 на английском языке. Работа содержит 26 рисунков, 4 таблицы и 9 приложений.