

Malwina Czarny (1) , Jolanta Kwiatkowska (2), Magdalena Słomska (1), Barbara Siemieniako (3), Ryszard Słomski (1,2,3)

Możliwości badawcze polimorficznych loci DNA człowieka i ich wykorzystanie w badaniach medyczno–sądowych.

Current possibilities of analysis of human polymorphic DNA loci and their application in forensic medicine.

1. Laboratorium Genetyki Molekularnej.
2. Zakład Genetyki Człowieka PAN.
3. Katedra Biochemii i Biotechnologii AR.

Przedstawiono możliwości badawcze polimorficznych loci DNA człowieka i ich wykorzystanie w badaniach medyczno–sądowych. Uwzględniono charakterystykę polimorficznych sekwencji satelitarnych, minisatelitarnych i mikrosatelitarnych. Krytycznie omówiono zalety i wady analizy multilocus oraz pojedynczego locus DNA z zastosowaniem techniki amplifikacji DNA in vitro lub technik hybrydyzacji z sondami molekularnymi.

Current possibilities of analysis of human polymorphic DNA loci and their application in forensic medicine are presented. Characteristics involved polymorphic sequences of DNA, especially satellite, minisatellite and microsatellite. Critical points of multilocus and single locus analysis using amplification of DNA in vitro or hybridization techniques are discussed.

WSTĘP

Pierwsze doniesienia o polimorfizmie DNA pochodzą z prac Chargaffa (8), który jeszcze przed poznaniem struktury DNA zauważył, że poszczególne gatunki można charakteryzować pod względem zawartości zasad G i C w DNA. Termin polimorfizm obejmuje wg. Vogel'a i Motulsky'ego "cechy dziedziczone zgodnie z prawami Mendla, które występują w populacji co najmniej w dwóch fenotypach i których częstość występowania przekracza 1%" (38). O polimorfizmie DNA decy-

dują najczęściej pojedyncze zmiany sekwencji nukleotydów, które mogą być obecnie dość łatwo wykrywane, gdyż prowadzą do powstania lub zaniku charakterystycznych sekwencji rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne. Badania DNA tego typu określono jako analizę RFLP – analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA. Olbrzymią zaletą badania RFLP jest łatwa wykrywalność heterozygotyczności. Polimorfizm DNA obserwowany w badaniach typu RFLP występuje w genomie co 200–300 par zasad (pz). Sekwencje polimorficzne nie są jednak równomiernie rozmieszczone w genomie. Polimorficzne sekwencje DNA, nie zmieniające miejsc restrykcji mogą być obecnie wykrywane metodą PCR lub hybrydyzacji z sondami molekularnymi swoistymi dla określonych alleli (ASO). Polimorfizm DNA może wynikać również z występowania sekwencji powtórzonych w genomie człowieka. Sekwencje powtórzone zalicza się do dwóch grup: grupa I obejmuje sekwencje tworzące duże tandemowe bloki, w których jednostki powtarzające się występują kolejno po sobie, natomiast grupa II obejmuje sekwencje tworzące małe tandemowe bloki zgrupowane lub rozproszone w genomie (39).

SATELITARNY DNA

Satelitarny DNA wraz z kilkoma rodzinami sekwencji należy do grupy I sekwencji powtórzonych. Zanim pojawiły się pierwsze prace o badaniach DNA metodą RFLP, czyli przed wykryciem enzymów restrykcyjnych i sond molekularnych, jedyną techniką badawczą umożliwiającą obserwację polimorfizmu DNA było wirowanie preparatów DNA w gradientach gęstości i obserwowanie tzw. satelitarnego DNA jako pasma towarzyszącego głównej frakcji genomowego DNA organizmów eukariotycznych. W dalszych badaniach wykazano, że frakcje satelitarnego DNA są sekwencjami ułożonymi tandemowo, w bloki złożone z kilku milionów krótkich motywów (4). Sekwencje te różnią się od całkowitego DNA podwyższoną zawartością par GC. Liczba powtórzeń i częstość ich występowania stanowi charakterystyczną cechę danego gatunku. Termin satelitarny DNA stosowany jest obecnie do określenia sekwencji tandemowych występujących z częstością 10^3 – 10^7 , przy czym długość motywu dochodzi zwykle do 300 pz, jednak zdarzają się dłuższe powtórzenia. Tatusz (36) uzupełniając określenie sekwencji satelitarnych zakłada, że oznacza ono sekwencje powtórzone 10^3 – 10^7 w każdym *locus*, z jednym lub dwoma *loci* na chromosomie dla danego typu jednostki powtórzonej, przy czym długość sekwencji powtórzonej wynosi od 2 do kilku tysięcy pz i że są to sekwencje charakterystyczne dla heterochromatyny, a w szczególności dla regionów centromerowych. U człowieka występują 4 frakcje satelitarne i stanowią one blisko 6% całkowitego DNA. W poszczególnych frakcjach występują homologiczne sekwencje tzw. rodziny wspólnych sekwencji (24). Jedną z charakterystycznych cech sekwencji satelitarnych jest występowanie konserwatywnych motywów. Stosując sekwencje powtórzone grzyoni jako sondy molekularne w hybrydyzacji z DNA człowieka wykazano, że wysoce konserwatywna jest sekwencja (GGAAT)*n*, która występuje u wszystkich Eukaryota.

Poza satelitarnym DNA do grupy I sekwencji powtórzonych należy kilka rodzin sekwencji. Jedną z rodzin – α satelitarny DNA – dominuje w genomie człowieka i sekwencje tej rodziny występują w centromerach wszystkich chromosomów. Pod-

stawowy motyw złożony jest z 171 pz i ułożony jest tandemowo w bloki o wielkości od 250 tys. do 4 mln pz. Innym przykładem rodziny sekwencji satelitarnego DNA są sekwencje β satelitarne, zwane również rodziną Sau3A, które występują z częstością 4×10^4 w genomie człowieka. Podstawową jednostką β satelitarnego DNA jest motyw złożony z 68 nukleotydów, tworzący jednostki wyższego rzędu.

SEKWENCJE MINISATELITARNE

W 1985 roku Jeffreys doniósł o nowej metodzie identyfikacji indywidualnej opartej o zjawisko polimorfizmu DNA (15,16). Metoda Jeffreys'a znalazła natychmiastowe zastosowanie w praktyce i pod nazwą DNA fingerprinting jest obecnie szeroko stosowana w badaniach pokrewieństwa, którego potrzeba zachodzi nie tylko w sprawach sądowych, lecz również niezbędna jest dla potrzeb medycznych w poradnictwie genetycznym, diagnostyce prenatalnej i transplantologii. Badania DNA fingerprinting są wykonywane rutynowo w ponad 30 krajach. Polimorficzne sekwencje DNA wykryte przez Jeffreys'a nazwano w odróżnieniu od sekwencji satelitarnych sekwencjami minisatelitarnymi. Termin sekwencje minisatelitarne został wprowadzony do oznaczania konserwatywnych sekwencji rdzeniowych, w wyizolowanym polimorficznym fragmencie sekwencji powtórzonej. Jak się potem okazało sekwencja GGGNNGTGGGG występuje w wielu opisanych dotychczas sekwencjach charakteryzujących się zmienną liczbą tandemowych powtórzeń i jest komplementarna do sekwencji "chi" u *E.coli*. Sekwencje rdzeniowe odpowiedzialne są prawdopodobnie za tworzenie minisatelitów i utrzymanie różnorodności powtarzanych jednostek w danym locus dzięki nierównemu crossing-over pomiędzy tandemowymi powtórzeniami. Jeffreys zastosował sekwencje rdzeniowe opisanych minisatelitów w hybrydyzacji z DNA człowieka spodziewając się, że te sekwencje będą hybrydyzować z wieloma loci w genomie. Użyte sondy oznaczone numerami: 33.6 i 33.15 różniące się między sobą długością i niektórymi nukleotydami w sekwencji rdzeniowej hybrydują z 17 loci genomowego DNA. Wartość diagnostyczną mają fragmenty wielkości od 3.5–20 tys. par zasad, pozostałe znacznie mniejsze nie dają czytelnego wyniku. Metoda DNA fingerprinting dostarcza informacji wyłącznie o fenotypie badanego DNA, lecz nie określa genotypu, gdyż w tym celu niezbędne są informacje o częstości poszczególnych loci i allelach w nich występujących.

Wkrótce po doniesieniach Jeffreys'a, Nakamura i wsp. (25) opisali dalsze loci sekwencji minisatelitarnych, wykazali polimorfizm powtarzających się jednostek jak również zaproponowali dla nich nazwę VNTR (ang. variable number of tandem repeats) – zmienna liczba tandemowych powtórzeń. Sekwencje minisatelitarne różnią się od sekwencji satelitarnych stopniem powtarzalności, długością jednostki powtarzającej, są bardziej rozproszone w genomie chociaż wykazują tendencje do grupowania się w regionach telomerowych, szczególnie w chromosomach człowieka. Charakterystyczną cechą sekwencji minisatelitarnych wg Tautza (36) jest powtarzanie się określonych sekwencji rdzeniowych od 2 do kilkuset razy w pojedynczym locus. Prawdopodobnie w genomie człowieka występuje kilka tysięcy takich loci, przy czym różnią się jednostkami rdzeniowymi. Każdy element powtarzający się złożony jest z 9 do 100 par zasad. Sklonowano już wiele sekwencji

minisatelitarnych specyficznych dla danego locus, lecz nadal trwają poszukiwania nowych (25, 26). Jako pierwsze opisane sekwencje minisatelitarne należy wymienić koniec 5' genu insuliny (33), genu mieliny, region JH ciężkiego łańcucha immunoglobuliny, koniec 3' genu CH ras, gen alfa-globiny, gen kolagenu typ II (34) i gen apolipoproteiny B (20). Najbardziej polimorficznym pojedynczym locus są fragmenty wykrywane sondą MS1. W locus występują allele o wielkości 1–23 tys. pz i prawie 99% osobników w populacji to heterozygoty. Jednostka powtarzająca złożona jest z 9 pz, co sugeruje występowanie ponad 2400 alleli (18, 33).

Funkcja biologiczna minisatelitarnego DNA nie jest jeszcze wyjaśniona, niemniej sekwencje zlokalizowane są w miejscach chromosomów, które są odpowiedzialne za tworzenie homologicznych par chromosomów i ich ewentualną rekombinację. Są to miejsca charakteryzujące się prawdopodobnie wysoką akumulacją regionów DNA o dużej zmienności. Nie wiadomo również, czy minisatelitarne sekwencje DNA ulegają ekspresji. Opisano dotychczas pojedyncze przypadki kodowania przez te sekwencje białek, np. locus MUC1 koduje mucynę.

Ponieważ sekwencje minisatelitarne wykazują wysoki stopień zróżnicowania, który pozostaje bez znaczącego efektu fenotypowego, prawdopodobnie regiony takie charakteryzują się wysoką częstością mutacji *de novo*, co wpływa na powstawanie nowych alleli. Wskaźnik mutacji dla komórek rozrodczych i somatycznych jest więc ważny i musi być uwzględniany przy dobieraniu systemu badawczego dla zakresu medyczno-sądowego. Mutacje komórek rozrodczych mogą powodować trudności w opiniowaniu pokrewieństwa, a mutacje somatyczne trudności związane z możliwościami wystąpienia różnic fenotypowych w poszczególnych tkankach tego samego organizmu. Dla przykładu częstość mutacji dla sondy molekularnej MS1 wynosi 0,05 na gametę i obniża wartość tego markera mimo heterozygotyczności przekraczającej 99%.

SEKWENCJE MIKROSATELITARNE

W genomie Eukaryota występują również powtórzenia mono-, di-, tri- i tetranukleotydowe. Litt i Luty (23) zaproponowali aby te sekwencje, w odróżnieniu od minisatelitów nazwać mikrosatelitami. W 1991 Edwards i wsp. (10) wprowadzili dodatkowo określenie STR (ang. short tandem repeat) – krótkie powtórzenia tandemowe. Wszystkie przebadane dotychczas sekwencje mikrosatelitarne od mononukleotydów do tetranukleotydów charakteryzują się polimorfizmem. W genomie człowieka najczęściej występują powtórzenia typu: A>AC>AAAN>AAN>AG (N oznacza A, C, G lub T), które stanowią 76% wszystkich sekwencji mikrosatelitarnych. Około 12% tych sekwencji stanowią tandemy o długości większej niż 40 nukleotydów. Prawie 80% sekwencji z grupy A, AAN, AAAN, 50% sekwencji typu AT oraz inne sekwencje mikrosatelitarne charakteryzujące się niską częstością występowania w genomie człowieka znajduje się w sąsiedztwie rodziny sekwencji Alu. Najczęściej w genomie człowieka spotyka się dwunukleotyd (CA)*n*/(GT)*n* potocznie określany powtórzeniem CA. W genomie człowieka występuje 50 000–100 000 kopii powtórzeń CA i pojawiają się średnio co 30 tys. par zasad w euchromatynie. Inne mikrosatelity jak (A)*n*/(T)*n* i (AAAT)*n*/(TTTA)*n* charakteryzują się również polimorfizmem i coraz częściej stosowane są w badaniach (35).

Obecnie w diagnostyce molekularnej najbardziej przydatne są sekwencje (NNN)_n i (NNNN)_n, które w porównaniu z sekwencjami (CA)_n wykazują dwie istotne zalety – łatwiejszy rozdział i identyfikacja poszczególnych alleli oraz mniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia artefaktów wywołanych błędami polimerazy. Przydatność tych sekwencji ograniczona jest jednak ich mniejszą częstością występowania w genomie. W 1989 roku trzy grupy równocześnie podały informację o różnorodności sekwencji mikrosatelitarnych wykrytą dzięki reakcji PCR (23, 25). Powtórzenia CA mogą być wyszukane w znanych sekwencjach genomu dzięki zastosowaniu programów komputerowych lub dzięki przeszukaniu tzw. bibliotek krótkich sekwencji sondami molekularnymi poli(dC–dA)/poli(dG–dT). Weissenbach i wsp. (40) obierając drugą strategię zidentyfikowali 5300 mikrosatelitów w genomie człowieka z czego 84% można amplifikować w reakcji PCR przy czym 93% zamplifikowanych markerów wykazuje polimorfizm. W badaniach mikrosatelitarnego DNA ukierunkowanych na analizy rutynowe niezbędne jest, aby markery mikrosatelitarne wykazywały heterozygotyczność w powyżej 70% badanej populacji.

Inną grupą sekwencji mikrosatelitarnych obejmuje powtórzenia 3 lub 4 nukleotydów. Rodzina powtarzających się tetranukleotydów GATA/GACA została zidentyfikowana i wyizolowana z satelitarnego DNA węża (11). Następnie wykazano, że tego typu powtórzenia występują u wszystkich Eukaryota, i że są polimorficzne. Dodatkową zaletą tych powtórzeń jest to, że po amplifikacji nie trzeba ich rozdzielać na dużych żelach sekwencyjnych jak to jest w przypadku powtórzeń CA. Trzy- i czteronukleotydowe powtórzenia występują co 300–500 tys. par zasad w chromosomie człowieka i są rozrzucone z tą samą częstością w całym genomie (około 10 000 loci). W diagnostyce molekularnej, a szczególnie w medycynie sądowej te sekwencje bardzo często poddaje się analizie, ponieważ charakteryzują się krótkimi, lecz polimorficznymi allelami co jest bardzo ważne, gdy analizowany jest częściowo zdegradowany DNA. Charakterystyka sekwencji satelitarnych, mikrosatelitarnych i mikrosatelitarnych została podsumowana w Tabeli I.

SONDY MOLEKULARNE STOSOWANE W RUTYNOWYCH BADAANIACH DNA

Po opublikowaniu pionierskiej pracy Jeffreys'a pojawiło się wiele doniesień o nowych sondach molekularnych, zarówno z ośrodków naukowych jak i firm komercyjnych (1, 25). Równoległe, dla wielu loci DNA człowieka, klasyczna hybrydyzacja wg Southerna została zastąpiona reakcją łańcuchową polimerazy – PCR (5, 6, 19). Doprowadziło to do wykształcenia się dwóch głównych kierunków badań, z których każdy posiada swoich zwolenników i przeciwników. Badania DNA fingerprinting można zasadniczo podzielić na dwie grupy. Pierwszą z nich stanowią analiza pojedynczego locus (ang. single locus system, SLS), natomiast druga grupa obejmuje jednoczesną analizę wielu loci (ang. multilocus system, MLS). Wymienione grupy badań można określić jako analizę jednopunktową lub wielopunktową. Wnioski co do identyfikacji lub pokrewieństwa badanych osób w sprawach o ustalenie ojcostwa formułowane są na podstawie porównania wielkości fragmentów DNA występujących u tych osób. Celem umożliwienia wnioskowania w oparciu o analizę jednopunktową konieczne jest wykonanie badań dla co najmniej 4–6

Tabela I. Charakterystyka powtórzeń DNA
Table I. Characteristics of DNA repeats

Charakterystyka	Satellity	Minisatellity	Mikrosatellity
Częstość powtórzeń	10^3-10^7	2-400	5-100
Liczba loci	1-2/chromosom	4000	10^4-10^5
Jednostka powtórzenia	200-5000 pz	7-100 pz	1- bpz
Lokalizacja	Heterochromatyna Centromery	Rozproszone Często telomery	Równomierne Często transkrybowane
Wykrywanie	Ultrawierowanie w gradiencie gęstości CsCl lub Ag-Cs ₂ SO ₄	Hybrydyzacja (1-20 tys. pz) PCR (100-1000 pz)	PCR (100-500 pz)
Zastosowanie	Identyfikacja chromosomów	Diagnostyka molekularna	Mapowanie genów Diagnostyka molekularna
Charakterystyczne motywy powtórzeń	Duża różnorodność	Duża różnorodność	A, AC, AAAT, AG, AT, AAAG
Występowanie	Człowiek, zwierzęta, rośliny, grzyby, bakterie	Człowiek, zwierzęta, rośliny, bakterie	Człowiek, zwierzęta

Tabela II. Porównanie technik badawczych stosowanych do badań powtórzeń DNA
 Table II. Comparison of techniques applied in analysis of DNA repeats

Rodzaj analizy	Hybrydyzacja z sondą		Amplifikacja DNA			
	Analiza wielopunktowa	Analiza jednopunktowa	Analiza jednopunktowa			
Rodzaj DNA	Genomowy	Genomowy	Genomowy	Genomowy	Antygeny HLA	Mitochondrium
Polimorfizm DNA	Minisatelity	Minisatelity	Minisatelity	Mikrosatelity	Polimorfizm DNA	Polimorfizm DNA
Informatywność	Bardzo wysoka	Wysoka	Średnia	Średnia	Średnia	Wysoka
Specyficzność	Niska	Bardzo wysoka	Bardzo wysoka	Bardzo wysoka	Bardzo wysoka	Bardzo wysoka
Różnicowanie DNA	Brak	Różnicuje	Różnicuje	Różnicuje	Różnicuje	Nie różnicuje
Genotyp	Nie ustala	Ustala	Ustala	Dobrze ustala	Dobrze ustala	Bardzo dobrze ustala
Określanie pokrewieństwa	Bardzo wysokie	Wysokie	Średnie	Średnie	Średnie	Macierzyństwo
Stopień trudności	Wysoki	Niski	Niski	Wysoki	Bardzo wysoki	Niski
Czasochłonność	1 tydzień	1 tydzień	2 dni	3 dni	3 dni	1 tydzień

Tabela III. Polimorficzne loci DNA stosowane w dochodzeniu spornego ojcostwa
 Table III. Polymorphic DNA loci used in paternity testing

Locus	Lokalizacja	Sonda	Motyw (PZ)	Allele	Heterozygotyczność (%)	Mutacje	Metoda	Startery dla PCR. lub sekwencja powtórzona w DNA	Produkt (pz)	Specyficzność gatunkowa
Multilocus		(CAC)5	15				H	(CAC)5		Brak
Multilocus		(TCC)5	15				H	(TCC)5		Brak
Multilocus		(GACA)4	16/23				H	(GACA)4		Brak
Multilocus		(GATA)4	16/23				H	(GATA)4		Brak
Multilocus		(CA)8	16				H	(CA)8		Brak
Multilocus		(GAA)6	18				H	(GAA)6		Brak
Multilocus		F10	12			0,004	H	TATGGTGGTGGT	4400–23100+	Brak
Multilocus		M13					H	GAGGGTGGXGGXTCT		Brak
Multilocus		MZ1.3	27			0,0003	H		1900–23000	Człowiek
D1S47	1	CRI–L336			88		H		2000–9000	Człowiek
D1S80	1p	pMCT118	16	31	84		PCR	GAAACTGGCCTCCAACACTGCCCGCCG GTCTTGTGGAGATGCACGTGCCCTTGC	430–814	Człowiek
D1S7	1p33–p35	MS1	9	>100	99	0,05	H	GTGGAYAGG	1200–19200	Człowiek
D1S111	1cen–q24	33.6				0,006	H	(AGGGCTGGAGG)3	3000–12000	Brak
D7S437	1q31.1–qter	33.15				0,006	H	AGAGGTGGGCAGGTGG	3000–25000	Brak
D1S8	1q42–q43	MS32	29	50	70	0,00001	H		<6000	Człowiek
APOB	2p24–p23	ApoB		14			PCR	ATGGAACGGAGAAATTATG CCTTCTCACTGGCAAATAC		Człowiek
D5S43	5q35–qter	MS8	30,29		86	<0,003	H	GGGCTGGGGAGATGGTGGAGGAGGTGTTGG AGGCTGGGGAGATGGTGGAGGAAGAGTACGTGGAYAGG	2200–13700	Człowiek
ACTBP2	6	SE33	4	>23	95		PCR	AATCTGGGCGACAAGAGTGA ACATCTCCCCTACCGCTATA		Człowiek
D6S22	6	CRI–L1077			83		H		500–2200	Człowiek
HLADQ α	6	HLADQ α		8			PCR		244–239	Człowiek

cd. Tabeli III

D7S104	7	CRI-S194			85		H		5000-11000	Człowiek
D7S21	7p22-pter	MS31	21		97	0,054	H	TGGGAGGTGGRYAGTGTCTG	3200-13000	Człowiek
D7S22	7q36-qter	G3	37		96	0,009	H	AGAAAGGCGGGYGGTGTGGGCAGGGAG RGGCAGGAAT	1600-14500	Człowiek
D11S129	11	CRI-R365			66		H		500-3500	Człowiek
HUMTHO1	11p15.5-p15	HUMTH1	4	8	79		PCR	GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT GTGAATCCCATTGGCCTG	178-202	Naczelne
D11S97	11q13	MS51			77	0,007	H		1300-4300	Człowiek
COL2A1	12q13.1			11			PCR	CCAGGTTAAGGTTGACAGCT GTCATGAACTAGCTCTGGTG		Człowiek
D12S11	12q24.3-qter	MS43A	45		96	0,002	H	TGTGTGTAATGGGTATAGGGAGGCCCCC GGGAAGGGGGTGTGGYG	3300-14300	Człowiek
D16S309	16p	MS205			97	0,004	H		1000-5500	Człowiek
D17S30	17	pYNZ22	70	>10			PCR	CGAAGAGTGAAGTGCACAGG CACAGTCTTTATTCTTCAGCG	170-870	Człowiek
D18S17	18	CRI-L159			84		H		1000-2000	Człowiek
D20S15	20	CRI-L355			83		H		800-6000	Człowiek
D21S112	21	CRI-L427			94		H		700-3400	Człowiek
DXS424	X			8			PCR	ACCTAGTTGGAGGCTATGCA CCCAGTTACTAACATCTATG	181-199	Człowiek
DXS52	X	St14	60	16			PCR	GGCATGTCATCACTTCTCTCATGTT CACCAGTGCCTCACGTCATT	700-3000	Człowiek
DYZ1	Y			1			PCR	ATTACACTACATTCCTTCCA AGTGAATTTGATGCAGTAGA	102	Człowiek
DYZ4	Y	CRI-DP105					H		<500-3100	Człowiek

H – analiza DNA metodą hybrydizacji z sondami molekularnymi

PCR – analiza DNA metodą amplifikacji DNA in vitro

Produkt – wielkość fragmentów DNA uzyskiwanych metodą PCR lub hybrydizacji z sondami

Rubryki nie wypełnione – brak danych w piśmiennictwie

niezależnych loci. Ocena pokrewieństwa przeprowadza się z uwzględnieniem częstości występowania długości fragmentów DNA obserwowanych w toku badań populacyjnych. Właśnie w tej kwestii wywiązała się gorąca dyskusja naukowa, gdyż niektóre stosowane w praktyce sondy molekularne SLP (single locus probes) wykrywają więcej niż 100 różnych fragmentów DNA i ocena częstości występowania w populacji każdego z tych wariantów nie jest możliwa. Wartość analizy jednopunktowej zależy więc od homogenności populacji i dla izolowanych grup etnicznych może być inna niż dla większej populacji,

Alternatywnym podejściem badawczym jest analiza multilocus, analiza wielopunktowa. Jednym z najlepiej udokumentowanych badań z tej grupy jest jednoczesne wykrywanie wielu fragmentów DNA przy użyciu sondy MZ 1.3 lub (CAC)5 (27). Jednoczesna analiza DNA człowieka w około 70 regionach zawiera tyle informacji, że jej ocena klasycznym modelem genetycznym nie jest obecnie możliwa, dlatego rozwinięto nowe metody analizy statystycznej, pozwalające sprowadzić wynik do wartości liczbowej. Założenia obliczeń statystycznych są dyskutowane od kilku lat, krytyka dotyczy przede wszystkim teoretycznych podstaw obliczeń. Na uwagę zasługują wyniki badań przedstawione w wielośrodkowej pracy 7 laboratoriów (2, 3), z których wynika, że w badaniach nad dochodzeniem spornego ojcostwa występują dwie nie nakładające się grupy – potwierzeń i wykluczeń. Na początku lat dziewięćdziesiątych pojawiły się doniesienia wskazujące na brak modelu genetycznego dla oszacowania wyników uzyskanych analizą multilocus. W odpowiedzi na krytycyzm pojawiły się doniesienia wykazujące ogromną dokładność i wysoką informatywność analizy wielopunktowej. Przyjmuje się, że ta analiza DNA obejmuje jednocześnie kilkadziesiąt loci i ostatnio przygotowano nowe metody statystyczne, pozwalające sprowadzić wynik badań do wartości liczbowej, np. prawdopodobieństwa ojcostwa (programy komputerowe, np. PATER lub PATERN).

Porównanie analizy DNA metodami hybrydyzacji z sondami molekularnymi i amplifikacji DNA matodą PCR przedstawiono w Tabeli II. Wady i zalety poszczególnych metod zostały przedstawione przez autorów w Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii (30, 31). Z Tabeli II wynika również, że badania mogą być wykonane także na mitochondrialnym DNA, co jest szczególnie ważne, gdy materiał badawczy wykazuje zdegradowanie DNA i jądrowy DNA, który mógłby służyć do badań nie występuje w dostatecznej ilości. Mitochondralny DNA nie może być stosowany w badaniach nad dochodzeniem spornego ojcostwa, ponieważ dziedziczony jest wyłącznie od matki. Analiza mitochondrialnego DNA jest bardzo przydatna w badaniach materiałów z ekshumacji lub katastrof i może być wykorzystana zarówno w badaniach antropologicznych jak i medyczno-sądowych. Wykaz najczęściej stosowanych w badaniach pokrewieństwa sond molekularnych i starterów w reakcji PCR oraz ich charakterystykę przedstawiono w Tabeli III.

PERSPEKTYWY ROZWOJU BADAŃ POLIMORFICZNYCH SEKWENCJI DNA

W najbliższej przyszłości oczekiwać można dalszego postępu badań polimorficznych sekwencji DNA. Autorzy zakładają, że postęp obejmował będzie zarówno

dobór materiału badawczego, jak i zwiększenie czułości metod oraz automatyzacji procedur analitycznych. W etapie wstępnym przygotowania materiału do badań występuje na pewno opóźnienie metodyczne i sprzętowe w stosunku do samej strategii badań DNA, która umożliwia wykrycie zmian pojedynczych nukleotydów. Etap przygotowania DNA do badań jest jednak najważniejszy, gdyż rzutuje na wykonywane analizy. Dla przykładu obecność inhibitorów enzymów w preparatach DNA uniemożliwi badanie DNA lub spowoduje powstanie artefaktów. Jest to szczególnie niebezpieczne przy stosowaniu badań opartych wyłącznie o enzymatyczną amplifikację DNA *in vitro*. Może dochodzić tu do wybiórczej amplifikacji niektórych alleli z pominięciem innych. Z kolei postęp w samych badaniach DNA jest ogromny i możliwe jest badanie małych ilości DNA, nawet z pojedynczych komórek. W przypadkach materiału przeznaczonego do badań medyczo–sądowych częstym zjawiskiem jest zdegradowanie DNA. Badania DNA mogą dać wtedy wynik fałszywie negatywny, dlatego wszelkie badania DNA poprzez jego amplifikację powinny przebiegać w obecności kontroli doświadczenia.

Zwiększenie czułości metod obejmować będzie coraz szersze wprowadzanie chemiluminiscencji i kolorymetrii do detekcji DNA, co w przyszłości zaowocować ma zautomatyzowaniem badania DNA na poziomie rozdzielności elektroforetycznej i detekcji wyniku. Trwają również poszukiwania nowych, optymalnych markerów do badań DNA, które charakteryzowałyby się wielkością w zakresie 100–500 pz i wykazywałyby duży polimorfizm wielkości oraz wysoki stopień heterozygotyczności, a jednocześnie niewielką częstość mutacji. Rozwój informatyki umożliwi przygotowanie specjalistycznych baz danych jednak z tym zagadnieniem bardzo silnie wiąże się standaryzacja badań wykonywanych przez różne placówki czy kraje. Problem ten na pewno nie ulegnie rozwiązaniu w najbliższej przyszłości, gdyż metody biologii molekularnej, a w szczególności PCR uwarunkowane są wieloma parametrami i ich standaryzacja nie jest obecnie możliwa.

PIŚMIENICTWO

1. Ali S., Muller C.R., Epplen J.T.: *DNA fingerprinting by oligonucleotide probes specific for simple repeats*. Hum. Genet., 1986, 74, 239–243. – 2. Bohm I., Krawczak M., Nurnberg P., Hampe J., Hundrieser J., Poche H., Peters C., Slomski R., Kwiatkowska J., Nagy M., Popperl A., Epplen J.T., Schmidtke J.: *Oligonucleotide DNA fingerprinting: results of a multi-center study on reliability and validity*. W DNA Fingerprinting: State of the Science, Wyd. S.D.J. Pena, R.Chakraborty, J.T.Epplen and A.J.Jeffreys, Birhauser Verlag, 1993, 257–260. – 3. Böhm I., Krawczak M., Nurnberg P., Hampe J., Hundrieser J., Poche H., Peters C., Slomski R., Kwiatkowska J., Nagy M., Popperl A., Epplen J.T., Schmidtke J.: *Paternity testing with oligonucleotide probe (CAC)₅/(GTG)₅ a multi-center study*. Forensic Science International, 1993, 59, 101–107. – 4. Britten R.J., Kohne D.E.: *Repeated sequences in DNA*. Science, 1968, 161, 529–540. – 5. Budowle B., Chakraborty R., Giusti A.M., Eisenberg A.J., Allen R.R.C.: *Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE*. Am. J.Hum.Genet. 1991, 48, 137–144. – 6. Budowle B.: *VNTR population data from various reference groups and the significance of application to identity testing*. W DNA Fingerprinting: State

- of the Science, Wyd. S.D.J. Pena, R.Chakraborty, T.J.Epplen and A.J.Jeffreys, Birhauser Verlag, 1993. – 7. Chakraborty R., Zhong Y., Jin L., Bowle B.: *Nondetectability of restriction fragments and independence of DNA fragment sizes within and between loci in RFLP typing of DNA*. Am. J.Hum., 1994, 55, 391–401. – 8. Chargaff E.: *Structure and function of nucleic acids as cell constituents*. Fed. Proc., 1951, 10, 654–659. – 9. Deka R., DeCruo S., Jin L., McGarvey T., Rothhammer F., Ferrel R.E., Chakraborty R.: *Population genetic characteristics of the D1S80 locus in seven human populations*. Hum. Genet., 1994, 94, 252–258. – 10. Edwards A., Civitello A., Hammond H.A., Caskey C.T.: *DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats*. Am. J.Hum. Genet., 1991, 49, 746–756.
11. Epplen J.T., McCarrey J.R., Sutou S., Ohno S.: *Base sequence of a cloned snake W-chromosome DNA fragment and identification of a male specific putative RNA in the mouse*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1982, 79, 3798–3802. – 12. Evett I.W., Werret D.J., Buckleton J.S.: *Paternity calculations from DNA multilocus profiles*. J.Forensic Sci. Soc., 1989, 29, 249–254. – 13. Hansen H.E., Morling N.: *Paternity with VNTR DNA systems I*, Int. J.Leg. Med., 1993, 105, 189–196. – 14. Hansen H.E., Morling N.: *Paternity testing with VNTR DNA systems II*. Int. J.Leg. med. 1993, 105, 197–202. – 15. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.W.: *Hypervariable “minisatellite” region in human DNA*. Nature, 1985, 314, 67–73. – 16. Jeffreys A.J., Wilson V., Thien S.W.: *Individual-specific “fingerprints” of human DNA*. Nature, 1985, 316, 76–79. – 17. Jeffreys A.J., Neumann R., Wilson V.: *Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis*. Cell, 1990, 60, 473–485. – 18. Jeffreys A.J., MacLeod A., Tamaki K., Neil D.L., Monckton D.G.: *Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing*. Nature 1991, 354, 204–209. – 19. Kasai K., Nakamura Y., White R.: *Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT 118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic sciences*. J.Forensic Sci., 1990, 35, 1196–1200. – 20. Knott T.J., Wallis S.C., Pease J., Powell L.M., Scott J.: *A hypervariable region 3' to the apolipoprotein B gene*. Nucleic Acid. Res., 1986, 14, 9215–9216.
21. Krawczak M., Bockel B.: *The formal analysis of multilocus DNA fingerprints*. W DNA Fingerprinting, Ed. S.D.J., Pena, R.Chakraborty, J.T.Epplen and A.J.Jeffreys, Birhauser Verlag, 1993, 249–255. – 22. Lander E.S., Budowle B.: *DNA fingerprinting dispute laid to rest*. Nature, 1994, 371, 735–738. – 23. Litt M., Luty J.A.: *A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene*. Am. J. Hum. Genet., 1989, 44, 397–401. – 24. Mitchell A.R., Baeuchamp R.S., Bostock C.J.: *A study of sequence homologies in four satellite DNAs of man*. J. Mol. Biol., 1979, 135, 127–149. – 25. Nakamura Y., Julier C., Wolff R., Holm R., O'Connell P., Leppert M., White R.: *Characterization of a human “midisatellite” sequence*. Nucleic Acids Res., 1987, 15, 2537–2547. – 26. Nakamura Y., Carlson M., Krapcho K., Kanamori M., White R.: *New approach for isolation of VNTR markers*. Am. J.Hum. Genet. 1988, 43, 854–859. – 27. Pena S.D.J., Chakraborty R., Epplen J.T., Jeffreys A.J.: *DNA Fingerprinting*, Ed. S.D.J. Pena, R.Chakraborty, T.J.Epplen and A.J. Jeffreys, Birhauser Verlag, 1993. – 28. Puers C., Wiegand P., Brinkmann B.: *Some technical parameters influencing the precision and accuracy of fragment size determination for RFLP's*. Int. J.Leg. Med., 1992, 105, 31–34. – 29. Słomski R., Jungermann J., Kraszewski A., Horst-Sikorska W.: *In vitro amplification of selected sequences of*

human genome. Biotechnologia, 1989, 2, 74–84. – 30. Słomski R., Kwiatkowska J., Chlebowska H.: *Application of molecular biology techniques in diagnosis of human diseases*. Biotechnologia, 1992, 4, 125–131.

31. Słomski R., Janiszewska H., Kwiatkowska J., Chlebowska H.: *Jednopunktowa a wielopunktowa analiza DNA: Własne obserwacje nad dochodzeniem spornego ojcostwa z zastosowaniem wielopunktowej analizy DNA*. Arch. Med. Sąd. i Krym., 1994, 44, 29–34. – 32. Słomski R., Janiszewska H., Chlebowska H., Kwiatkowska J., Słomska M.: *Porównanie analiz multilocus i pojedynczego locus w dochodzeniu spornego ojcostwa*. Arch. Med. sąd. i Krym., 1994, 44, 239–243. – 33. Smith J.C., Anwar R., Riley J., Jenner D., Markham A.F., Jeffreys A.J.: *Highly polymorphic minisatellite sequences: Allele frequency and mutation rates for five locus specific probes in Caucasian population*. J. Forensic Sci. Soc., 1990, 30, 19–32. – 34. Stoker N.G., Cheah K.S.E., Griffin J.R., Pope F.M., Solomon E.: *A highly polymorphic region 3' to the human type II collagen gene*. Nucleic Acids Res., 1985, 13, 4613–4622. – 35. Tautz D.: *Hypervariability of simple sequences as a general source of genetic variation*. Nucleic Acids Res., 1989, 17, 6463–6471. – 36. Tautz D.: *Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences*. W DNA Fingerprinting: State of the Science, Wyd. S.D.J. Pena, R. Chakraborty, J.T. Epplen and A.J. Jeffreys Birhauser Verlag, 1993. – 37. Toneli L.A., Markowicz K.R., Anderson M.N., Green D.J., Herrin G.L., Cotton R.W., Dykes D.D., Garner D.D.: *Use of deoxyribonucleotide acid (DNA) fingerprints for identity determination: comparison with traditional paternity testing methods – part I*. J. Forensic Sci., 1990, 35, 1265–1269. – 38. Vogel F., Motulsky A.G.: *Human Genetics – Problems and Approaches*, Wyd. 2. Springer, Berlin, 1986. – 39. Vogt P.: *Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on highly conserved “chromatin folding code”*. Hum. Genet. 1990, 84, 301–336. – 40. Weissenbach J., Gyaypay G., Dib C., Vignal A., Morissette J., Milasseau P., Vaysseiz G., Lathrop M.: *A second-generation linkage map of the human genome*. Nature, 1992, 359, 794–801.

Adres pierwszego autora:

Laboratorium Genetyki Molekularnej

ul. Szeherazady 100

60–195 Poznań

Wpłynęło do redakcji: 5.07.1995

Zakwalifikowano do druku: 3.10.1995.