

RYSZARD SŁOMSKI^{1, 2, 3}, JOLANTA KWIATKOWSKA¹,
HANNA CHLEBOWSKA¹, BARBARA SIEMIENIAKO²,
MAGDALENA SŁOMSKA³

¹Zakład Genetyki Człowieka PAN
Strzeszyńska 32, 60–479 Poznań

²Katedra Biochemii i Biotechnologii AR
Wołyńska 35, 60–637 Poznań

³Laboratorium Genetyki Molekularnej
Szeherazady 100, 60–195 Poznań

POLIMORFICZNE SEKWENCJE DNA I ICH ZASTOSOWANIE W DOCHODZENIU SPORNEGO OJCOSTWA

Diagnostyka molekularna należy do najbardziej dynamicznie rozwijających się działów biologii i medycyny. Najwcześniej, bo już w połowie lat 80-tych znalazła ona zastosowanie w genetyce człowieka. Złożyło się na to wiele czynników, przede wszystkim wprowadzenie sond molekularnych i enzymów restrykcyjnych, jak również nowych technik badawczych, takich jak: klonowanie DNA, blotting Southerna, sekwencjonowanie, znakowanie i detekcja DNA, PCR i synteza oligonukleotydów a także ogromne zapotrzebowanie na precyzyjne badania diagnostyczne rodzin z ryzykiem wystąpienia chorób genetycznych.

Wcześniejsze doniesienia z zakresu diagnostyki molekularnej były przedstawiane w artykułach autorów zamieszczonych w *Postęпах Biochemii* (JARUZELSKA i SŁOMSKI 1990, JUNGEMAN i SŁOMSKI 1990, SŁOMSKI i współaut. 1992, KWIATKOWSKA i SŁOMSKI 1992), *Biotechnologii* (SŁOMSKI i współaut. 1989, SŁOMSKI i współaut. 1993) i *Kosmosie* (JUNGEMAN i SŁOMSKI 1987). Obecnie w diagnostyce molekularnej można wyróżnić kierunki badań rutynowych oraz wskazać perspektywę jej dalszego rozwoju w biologii i medycynie.

Doskonałym przykładem postępu diagnostyki molekularnej i jej wykorzystania w praktyce jest dochodzenie spornego ojcostwa. W 1985 roku JEFFREYS i współpracownicy (1985a, b) donieśli o nowej metodzie identyfikacji indywidualnej opartej o zjawisko polimorfizmu DNA. Metoda Jeffreys'a znalazła natychmiastowe zastosowanie w praktyce i pod nazwą DNA fingerprinting jest obecnie szeroko stosowana w diagnostyce molekularnej (tab. 1). Potrzeba określenia ojcostwa występuje nie tylko w sprawach sądowych o ustalenie spornego ojcostwa, lecz również niezbędna jest dla potrzeb medycznych w poradnictwie

genetycznym, diagnostyce prenatalnej i transplantologii. Badania DNA fingerprinting są wykonywane rutynowo w ponad 30 krajach. W USA wykonuje się rocznie ponad 100 tysięcy tych testów i liczba ta wykazuje tendencję wzrostową. W Polsce ten rodzaj analizy DNA został wdrożony przez SŁOMSKIEGO i współpracowników w 1987 roku i analiza jest obecnie wykonywana rutynowo w placówkach we Wrocławiu, Lublinie i Poznaniu. W badaniach wykorzystuje się polimorfizm sekwencji powtórzonych w DNA.

Tabela 1

Wdrożenie do badań rutynowych analizy polimorfizmu DNA

1985	w marcu A. Jeffreys opisał technikę DNA fingerprinting
1985	w kwietniu dopuszczono dowód z analizy DNA w postępowaniu imigracyjnym
1985	w Wielkiej Brytanii dopuszczono dowód z analizy DNA w dochodzeniu spornego ojcstwa
1986	w październiku w Wielkiej Brytanii dopuszczono dowód z analizy DNA w wykryciu sprawcy morderstwa
1987	wyniki analizy DNA dopuszczono do postępowania w sądach Wielkiej Brytanii i USA
1987	rozpoczęcie wykonywania badań DNA fingerprinting w Polsce
1988	zastosowanie analizy DNA w badaniach rodzinnych
1989	w USA ostra krytyka badań polimorfizmu DNA wykorzystywanych do orzeczeń sądowych
1990	Kongres USA zaakceptował badania typu DNA fingerprinting
1991	ostra krytyka oceny statystycznej badań polimorfizmu DNA
1992	Komitet Badań Naukowych USA uznaje badania DNA jako niezmiennie cenne przy identyfikacji indywidualnej
1993	rozpoczęcie rutynowego wykonywania badań polimorfizmu DNA w ponad 30 krajach

Sekwencje powtórzone, występujące w genomie człowieka, 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 (VOGT 1990). Grupa I sekwencji powtórzonych jest reprezentowana przez sekwencje satelitarne DNA oraz rodziny sekwencji powtórzonych, natomiast do grupy II należą sekwencje minisatelitarne i mikro-satelitarne.

SATELITARNY DNA

Sekwencje satelitarne są sekwencjami ułożonymi tandemowo obok siebie, w bloki złożone z kilku milionów krótkich motywów (BRITTEN i KOHNE 1968). Różnią się od całkowitego DNA podwyższoną zawartością par GC. Nazwa sekwencji satelitarne pojawiła się zanim wykazano, że składają się one z tandemowych powtórzeń. Nazwa wynikała z obserwacji wirowania preparatów DNA w gradien-

cie gęstości CsCl, gdzie sekwencje te tworzyły dodatkowe frakcje. DNA Eukaryota tworzy w czasie wirowania w gradiencie gęstości dwie lub nawet kilka frakcji w odróżnieniu od genomowego DNA Prokaryota tworzącego jedną frakcję. Liczba powtórzonych sekwencji i częstość ich występowania stanowią charakterystyczną cechę danego organizmu. Niektóre sekwencje powtórzone charakteryzują się taką samą zawartością nukleotydów GC, jak pozostały genomowy DNA. Ten typ sekwencji to tak zwane satelity kryptyczne, ponieważ frakcjonują się one razem z główną frakcją genomowego DNA. Termin satelitarny DNA jest stosowany obecnie do określenia sekwencji tandemowych występujących z częstością 103–107. Zwykle długość sekwencji powtórzonej dochodzi do 300 par zasad, czasami zdarzają się dłuższe. Według TAUTZA (1993) określenie satelitarny DNA oznacza sekwencje powtórzone 103–107 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 par zasad i są to sekwencje charakterystyczne dla heterochromatyny, a w szczególności dla regionów centromerowych.

SEKWENCJE MINISATELITARNE

Najbardziej polimorficzne sekwencje w genomie człowieka składają się z tandemowo powtarzających się sekwencji minisatelitarnych (NAKAMURA i współaut. 1987) i obecnie są szeroko stosowane w diagnostyce molekularnej. Termin sekwencje minisatelitarne został wprowadzony przez JEFFREYS'A i współpracowników (1985a) do oznaczania konserwatywnych sekwencji rdzeniowych, w wyizolowanym polimorficznym fragmencie sekwencji powtórzonych. 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 *Escherichia coli*. Sekwencje rdzeniowe są odpowiedzialne prawdopodobnie za tworzenie minisatelitów i utrzymanie różnorodnej liczby powtarzanych jednostek w danym locus dzięki nierównemu crossing-over pomiędzy tandemowymi powtórzeniami. Minisatelity zostały wykryte równocześnie w wielu placówkach, gdzie jednocześnie wykazano ich polimorfizm (BELL i współaut. 1982). Jeffreys jako pierwszy wykazał, że sekwencje minisatelitarne należą do sekwencji występujących powszechnie w genomach, że są uorganizowane w powtarzające się jednostki i jako pierwszy zastosował w praktyce badawczej minisatelity, wprowadzając do badań technikę DNA fingerprinting (JEFFREYS i współaut. 1985b). 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, hybrydyzują z 17 loci genomowego DNA. Wartość diagnostyczną mają fragmenty wielkości od 3,5–20 tys. par zasad, pozostałe znacznie mniejsze nie dają czytelnego wyniku.

NAKAMURA i współpracownicy (1987) 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 (ROYLE i współaut. 1988). Charakterystyczną cechą sekwencji minisatelitarnych, według TAUTZA (1993) 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 jest złożony z 9 do 100 par zasad. Obecnie sklonowano już wiele sekwencji minisatelitarnych, specyficznych dla danego locus. Nadal trwają poszukiwania nowych. Stosuje się w tym celu klony wykrywające zmienne powtórzenia i przeszukuje nimi biblioteki genomowego DNA (KNOWLTON i współaut. 1986). W tym hybrydyzuje się DNA z bibliotek z sondami oligonukleotydowymi o sekwencji odpowiadającej wcześniej opisanym sekwencjom VNTR (NAKAMURA i współaut. 1987, 1988) lub wkłonnuje w bakteriofaga lambda fragmenty wyizolowane z mieszaniny fragmentów powtarzających, powstającej po trawieniu genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi z grupy często tnących, i hybrydyzuje z rdzeniami sekwencji powtórzonych. Opisane jako pierwsze tego typu sekwencje minisatelitarne należy wymienić koniec 5' genu insuliny (SMITH i współaut. 1990), gen mieliny (BOYLAN i współaut. 1987), region JH ciężkiego łańcucha immunoglobuliny (SILVA i współaut. 1987), koniec 3' genu CH ras (CAPON i współaut. 1983), gen alfa-globiny (HIGGS i współaut. 1986), gen kolagenu typ II (STOKER i współaut. 1985) i gen apolipoproteiny B (KNOTT i współaut. 1986). Najbardziej polimorficzny pojedynczy locus zawiera fragmenty wykrywane sondą MS1, którego allele są wielkości rzędu 1–23 tys. pz i prawie 99% osobników w populacji to heterozygoty. Jednostka powtarzająca jest złożona z 9 pz i dotychczas opisano 2400 alleli dla tej sondy (WONG i współaut. 1987, SMITH i współaut. 1990b, JEFFREYS i współaut. 1991). Jeżeli jako sondy stosuje się tandemowe powtórzenia konserwatywnego motywu sekwencji minisatelitarnych, wówczas w hybrydyzacji Southerna otrzymuje się dla każdego osobnika jednocześnie wiele różnych fragmentów DNA; powstaje specyficzny dla osobnika „fingerprint”. Do takich sond należą między innymi wspomniane już wcześniej sondy 33.6 i 33.15.

SEKWENCJE MIKROSATELITARNE

W genomie *Eukaryota* występują powtórzenia mono-, di-, tri- i tetranukleotydowe. LITT i LUTY (1989) zaproponowali, aby te sekwencje w odróżnieniu od minisatelitów nazwać mikrosatelitami. W 1991 roku EDWARDS i współpracownicy wprowadzili dodatkowo określenie STR (ang. short tandem repeat) — krótkie powtórzenia tandemowe. Skrót STR jest również często stosowany do określenia syntetycznych powtórzeń tandemowych w technice DNA fingerprinting (VERGNAUD i współaut. 1991), dlatego w ostatnim okresie zalecany terminem są sekwencje mikrosatelitarne.

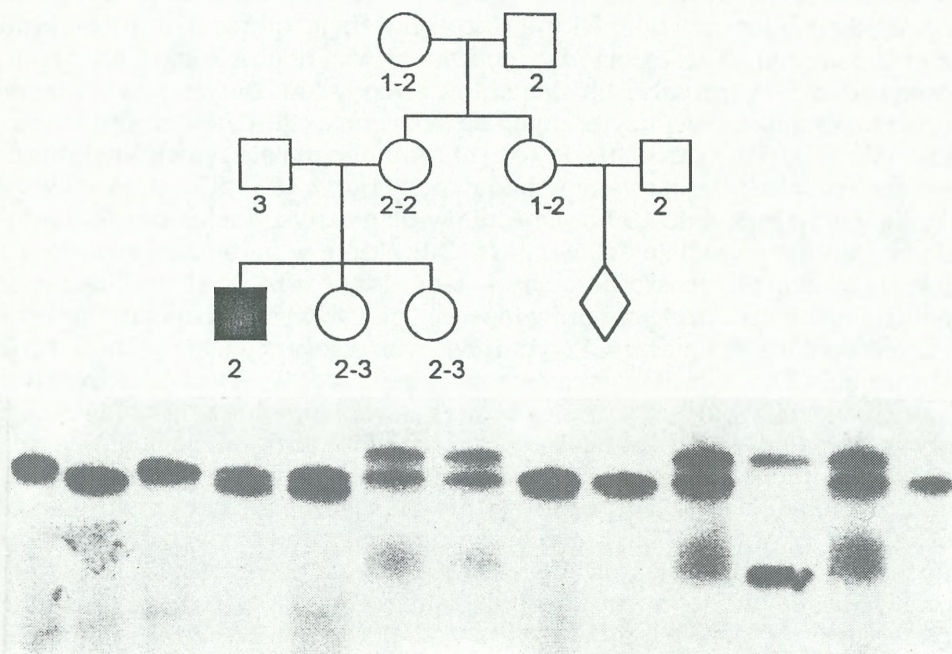
Wszystkie przebadane dotychczas sekwencje mikrosatelitarne od mononukleotydów do tetranukleotydów charakteryzują się polimorfizmem. W genomie

człowieka najczęściej występują powtórzenia typu: A > AC > AAAN > AAN > AG (N oznacza cytozynę guaninę lub tymidynę), 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 rozproszonych elementów rodziny Alu. Dotychczas w diagnostyce pośredniej najbardziej użytecznymi są sekwencje (CA)_n/(GT)_n. Inne mikrosatelity, jak (A)_n/(T)_n i (AAAT)_n/(TTTA)_n charakteryzują się również polimorfizmem i coraz częściej są stosowane w badaniach (TAUTZ 1989, ECONOMOU i współaut. 1990, ZULIANI i HOBBS 1990). Obecnie w diagnostyce molekularnej najbardziej są przydatne 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 jest ograniczona jednak ich mniejszą częstością występowania w genomie. Większość sekwencji mikrosatelitarnych, zlokalizowanych w sekwencjach Alu, występuje w regionie 3' tych sekwencji w pozycji, w której zazwyczaj występują sekwencje poli(A). Trzy grupy sekwencji mikrosatelitarnych (dwie: (A)_n/(T)_n i jedna ((AC)_n/(TG)_n, (AG)_n/(TC)_n)) znaleziono w sekwencjach rodziny Alu w miejscu przeznaczonym dla krótkich sekwencji typu (A)_n/(T)_n. Dotychczas nie wykazano sekwencji mikrosatelitarnych w regionie 5' elementów Alu (BECKMAN i WEBER 1992). Najczęściej w genomie człowieka spotyka się dwunukleotyd (CA)_n/(GT)_n potocznie określany powtórzeniem CA (ryc. 1). Występuje 50 000–100 000 kopii powtórzeń CA w genomie człowieka i pojawiają się średnio co 30 tys. par zasad w euchromatynie (STALLINGS i współaut. 1991). W 1989 roku trzy grupy równocześnie podały informacje o różnorodności sekwencji mikrosatelitarnych wykrytą dzięki reakcji PCR (WEBER i MAY 1989, LITT i LUTY 1989, TAUTZ 1989). Powtórzenia CA mogą być wyszukane w znanych sekwencjach genomu dzięki zastosowaniu programów komputerowych lub dzięki przeszukaniu bibliotek krótkich sekwencji z sondami poli(dC-dA)/poli(dG-dT). WEISSENBACH i współpracownicy (1992) obierając drugą strategię zidentyfikowali 2995 mikrosatelitów w genomie człowieka, z czego 84% (2506) zostało zamplikowanych. Jak się potem okazało 93% zamplikowanych markerów wykazywało polimorfizm.

Inna grupa sekwencji mikrosatelitarnych obejmuje powtórzenia 3 lub 4 nukleotydów. Rodzina powtarzających się tetranukleotydów GATA/GACA została zidentyfikowana i wyizolowana z satelitarnego DNA węża (EPPLEN i współaut. 1982). Następnie wykazano, że tego typu powtórzenia występują u wszystkich *Eukaryota*, i są również 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) (EDWARDS i współaut. 1991). 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.

Mikrosatelity CA w rodzinie z dystrofią Duchenne'a



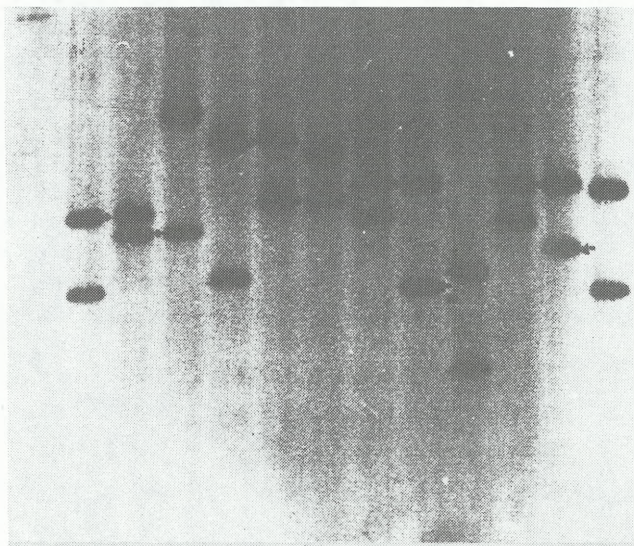
Ryc. 1. Analiza powtórzeń CA w regionie 3' genu *DMD* człowieka.

Badanie polimorfizmu powtórzeń CA jest wykorzystywane w diagnostyce molekularnej dystrofii mięśniowej Duchenne'a (NIEMAN-SEYDE i współaut. 1992, KWIATKOWSKA i SŁOMSKI 1992). Reakcję PCR wykonano z primerami znakowanymi 32-P na końcach 5'. Wykonano 30 cykli reakcji: 1 min, 92°C; 1 min, 55°C; 1 min 30 sek, 65°C. Produkty reakcji frakcjonowano w 8% żelu poliakryloamidowym, w warunkach denaturujących, przy 1400 V, przez 5 godz. Tor 1 — chory na DMD; tor 2 — ojciec chorego; tor 3 — matka chorego; tor 4 — siostra 1 chorego; tor 5 — siostra 2 chorego; tor 6 i 7 — kobieta w ciąży (siostra matki chorego); tor 8 — mąż ciężarnej; tor 9 — dziadek chorego (ojciec matki chorego i kobiety w ciąży); tor 10 — babcia chorego; tor 11-13 — kontrole (drabina alleli). Ponieważ jest to przypadek rodzinny DMD analiza wykazała, że kobieta w ciąży nie jest nosicielką DMD.

WYKORZYSTANIE POLIMORFIZMU DNA W PRAKTYCE

W 1974 roku ukazało się doniesienie CHAKRABORTY'EGO i współpracowników *Exclusion of paternity: the current state of the art*, a blisko 20 lat później PENA i współpracownicy (1993) wydali książkę *DNA Fingerprinting: State of the Science* zbierającą najnowsze osiągnięcia z zastosowania badań DNA w praktyce. Po opublikowaniu pionierskiej pracy Jeffreys'a pojawiło się wiele doniesień o nowych sondach molekularnych, zarówno z ośrodków naukowych, jak i firm komercyjnych (ALI i współaut. 1986, NAKAMURA i współaut. 1987, VASSART i współaut. 1987, VERGNAUD i współaut. 1989). Równolegle, dla wielu loci DNA człowieka klasyczna hybrydyzacja według Southerna została zastąpiona reakcją

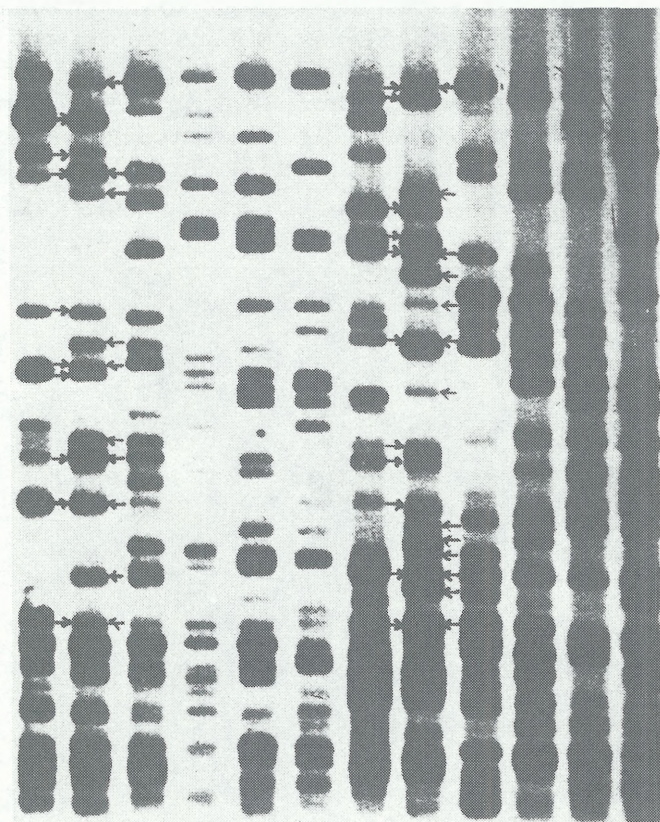
łańcuchową polimerazy — PCR (KASAI i współaut. 1990, BUDOWLE 1991, BUDOWLE i współaut. 1993). Doprowadziło to do wykształcenia się dwóch głównych kierunków badań, z których każdy posiada swoich zwolenników i przeciwników. Badania DNA fingerprinting można zasadniczo podzielić na dwie grupy. Pierwszą z nich stanowi 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 są formułowane na podstawie porównania wielkości fragmentów DNA występujących u tych osób. Celem umożliwienia jednoznacznego wnioskowania w oparciu o analizę jednopunktową jest konieczne wykonanie badań dla co najmniej 4 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. Przykład analizy SLS przedstawiono na rycinie 2.



Ryc. 2. Zastosowanie analizy polimorfizmu pojedynczego locus (analiza SLS) w badaniach pokrewieństwa.

DNA badanych rodzin (matka, dziecko, domniemany ojciec) trawiono enzymem restrykcyjnym *Hinf*I a następnie wykonano blotting i hybrydyzację według Southerna z sondą molekularną MS31. Strzałkami zaznaczono prążki dziecka występujące u rodziców. Locus wykazuje ogromny polimorfizm, prawdopodobnie ponad 100 alleli. Wszystkie badane osoby są heterozygotami.

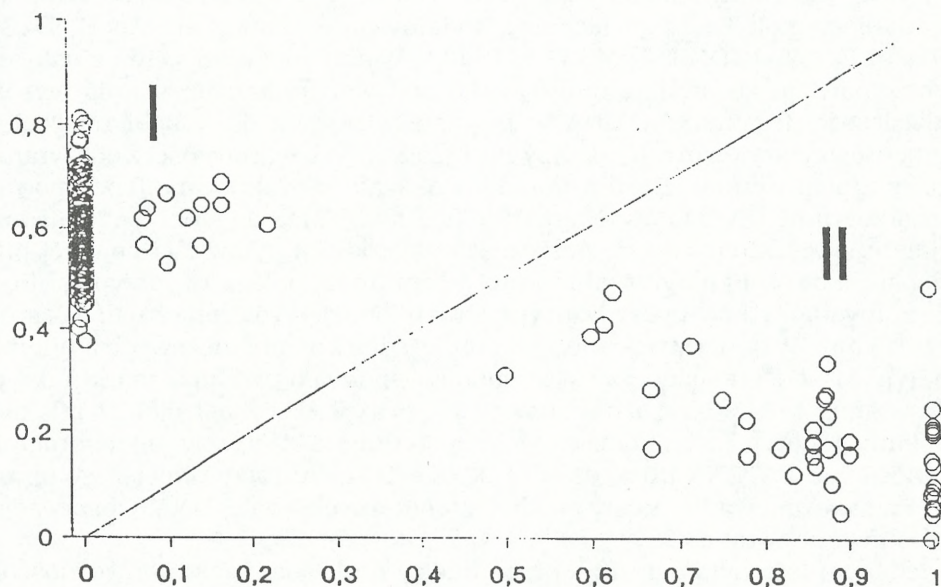
Alternatywnym podejściem badawczym jest analiza multilocus, analiza wielopunktowa. Jednym z najlepiej udokumentowanych badań z tej grupy jest jednoczesne wykrywanie wielu fragmentów DNA przy użyciu sondy MZ 1.3 lub (CAC)5 (PENA i współaut. 1993). Wysokiej informatywności sondy towarzyszy skomplikowana analiza wyniku, który odpowiada rozdzielonym elektroforetycznie fragmentom DNA i jest swoisty dla badanej osoby (z wyjątkiem bliźniąt monozygotycznych, dla których układ prążków jest jednakowy). Przykład analizy MLS przedstawiono na rycinie 3. Autorzy niniejszej pracy uczestniczyli w ostatnich latach w wieloośrodkowych badaniach nad rutynowym stosowaniem analizy DNA fingerprinting. Uzyskane wyniki badań z zastosowaniem sondy (CAC)5\ (GTG)5, przeprowadzonych niezależnie w sześciu laboratoriach niemieckich, posiadających wieloletnią tradycję w badaniach molekularnych i w naszym laboratorium, w pełni potwierdzają przydatność analizy wielopunktowej (BOHM i współaut. 1993, KRAWCZAK i BOCKEL 1993).



Ryc. 3. Zastosowanie analizy polimorfizmu multilocus (analiza MLS) w badaniach pokrewieństwa.

DNA badanych rodzin (matka, dziecko, domniemany ojciec) trawiono enzymem restrykcyjnym *Hinf*I, a następnie wykonano blotting i hybrydizację według Southerna z sondą molekularną (CAC)5. Strzałkami zaznaczono prążki dziecka występujące u rodziców. Ten rodzaj analizy obejmuje jednocześnie ponad 70 loci.

Jednoczesna analiza DNA człowieka w około 70 regionach zawiera tyle informacji, że jej ocena klasycznym modelem genetycznym nie jest obecnie możliwa. Rozwinięto nowe metody analizy statystycznej, pozwalające sprowadzić wynik do wartości liczbowej. Założenia obliczeń statystycznych są dyskutowane na świecie od kilku lat, krytyka dotyczy przede wszystkim teoretycznych podstaw obliczeń. Na uwagę zasługują wyniki badań przedstawione w wielośrodkowej pracy 7 laboratoriów, z których wynika, że w badaniach nad dochodzeniem spornego ojcostwa występują 2 grupy. Na rycinie 4 przedstawiono 2 grupy spraw obejmujące potwierdzenia (grupa I) i wykluczenia (grupa II). W grupie I zauważyć można kilkanaście przypadków, w których u dziecka wystąpiły mutacje. Ich występowanie nie wpłynęło jednak na zakwalifikowanie danej sprawy do grupy potwierdzeń lub wykluczeń ojcostwa. Analiza wielopunktowa niewątpliwie należy do grupy badań trudnych, a jej wykonywanie powinno być ograniczone do wyspecjalizowanych ośrodków.



Ryc. 4. Zastosowanie analizy multilocus w dochodzeniu spornego ojcostwa.

Na rycinie przedstawiono proporcję prążków aberracyjnych dziecka i prążków wspólnych domniemanego ojca i dziecka. Linia prosta odpowiada równowadze obydwu wartości. Każdy znak reprezentuje jedną badaną trójkę (matka, dziecko, domniemany ojciec). Wszystkie badane przypadki można zakwalifikować do dwóch grup: I — grupa trójek, w których analiza potwierdziła ojcostwo; II — grupa trójek, w których analiza wykluczyła ojcostwo. W grupie I u około 5% występują prążki aberracyjne (mutacje), które nie wpływają jednak na końcowy wynik analizy.

W badaniach medycyny sądowej analiza multilocus ogranicza się wyłącznie do badania materiału, z którego wyizolowano wysokocząsteczkowy DNA. Tylko wtedy jest możliwe przeprowadzenie badań techniką blottingu według Southerna. Najczęściej materiał do badań jest zdegradowany, stąd są analizowane stosunkowo krótkie (kilkaset nukleotydów) odcinki DNA, a techniką z wyboru jest PCR.

Na początku lat dziewięćdziesiątych pojawiły się doniesienia wskazujące na brak modelu genetycznego dla oszacowania wyników uzyskanych analizą multi locus. W odpowiedzi na krytycyzm pojawiły się doniesienia wykazujące ogromną dokładność i wysoką informatywność analizy wielopunktowej. Przyjmuje się, że wielopunktowa analiza ludzkiego DNA obejmuje jednocześnie kilkadziesiąt loci i ostatnio przygotowano nowe metody analizy statystycznej, pozwalające sprowadzić wynik do wartości liczbowej, na przykład prawdopodobieństwa ojcostwa (programy komputerowe, np. PATER lub PATTERN).

W naszym laboratorium standardowa analiza obejmuje wykonanie zarówno analizy multi locus, jak i pojedynczego locus. W badaniach multi locus najczęściej jest stosowany układ *Hinf*I lub *Hae*III i sonda (GTG)₅, natomiast w badaniach pojedynczego locus są wykonywane analizy dla ApoB, D1S80, D17S30, COL2A1, DXS52, MS31 i MS43A. Własne doświadczenia z ostatnich lat przemawiają za analizą multi locus, pod warunkiem uzyskania wysokiej rozdzielczości fragmentów DNA w zakresie większym od 4 kb i rozdzielenia fragmentów restrykcyjnych tak, aby nie było żadnych wątpliwości z odczytaniem i interpretacją wyniku. Bardzo pomocne okazało się tak zwane fenotypowanie autoradiogramu (EVETTI i współaut. 1989a, 1989b). Metodą fenotypowania autoradiogramów posługiwały się poszczególne ośrodki w cytowanej powyżej pracy wielośrodkowej. Fenotypowanie autoradiogramów polega na przypisaniu poszczególnych prążków hybrydizacyjnych strefom elektroforetycznym o szerokości 1–1,5 mm. W danej strefie może wystąpić jeden z ośmiu możliwych fenotypów. Fenotyp M+ D+ O+ oznacza wystąpienie wspólnego prążka u matki, dziecka i ojca, zapis M- D+ O+ oznacza wspólny prążek dziecka i ojca, i tak dalej. Uzyskany fenotyp jest oszacowany statystycznie z zastosowaniem programu FINGPED lub PATTERN (KRAWCZAK i BOCKEL 1992). Autorzy niniejszego opracowania zauważają wady i zalety obydwu stosowanych analiz DNA. Obserwacje te przedstawiono w tabeli 2.

Jedynym istotnym ograniczeniem analizy multi locus jest konieczność stosowania wysokospolimeryzowanego DNA. W badaniach spornego ojcostwa tego rodzaju ograniczenia nie występują ze względu na izolowanie DNA ze świeżo pobranej krwi. W badaniu śladów biologicznych może to stanowić bardzo istotny czynnik ograniczający i dlatego w tych badaniach coraz większe zastosowanie znajduje analiza pojedynczego locus, w szczególności w powiązaniu z reakcją PCR.

Przedstawione wady obydwu analiz dotyczą głównie problemów technicznych, nie wpływających na wartość i przydatność obydwu metod. Z naszych obserwacji wynika, że występują również takie przypadki, w których analiza multi locus pozwala na wykluczenie ojcostwa, podczas gdy po trzech kolejnych analizach pojedynczego locus nie ma podstaw do jego wykluczenia. Uważamy więc, że analiza multi locus powinna być stosowana jako analiza podstawowa,

a analizy pojedynczego locus jako wspierające lub uzupełniające. Ogólny schemat wykonywania przez nasze laboratorium analizy multi locus przedstawiono na rycinie 3.

Interesującą grupą, którą należy traktować ze szczególną uwagą, jest grupa 3, w której u dziecka występuje jeden prążek, którego pochodzenia nie można przypisać ani od matki, ani od ojca. Taki prążek może być wynikiem mutacji lub ewentualnego niepełnego strawienia DNA enzymem restrykcyjnym. W naszych badaniach błąd wynikający z nie strawienia DNA nie wystąpił, co potwierdzono powtarzając analizy. Prążki mutacyjne występują z częstością poniżej 0,05. Rozróżnienie prążka mutacyjnego nie stwarza w praktyce dużych trudności.

Tabela 2

Technika Southern blotting czy PCR w dochodzeniu spornego ojcostwa?

	Blotting Southerna	PCR
Ilość DNA	5–10 µg	100 µg (możliwość pracy nawet z pojedynczymi komórkami)
Czas	1 tydzień	1 dzień
DNA	wysokocząsteczkowy	może być częściowo zdegradowany
Koszty	pracochłonna, duży nakład materiałów	niskie
Informatywność	wysoka informatywność wynikająca z kompleksowości i dużej liczby alleli; liczba alleli powyżej 99%	niska heterozygotyczność, możliwość preferencyjnej amplifikacji alleli, mniejsza liczba alleli
Wielkość alleli	2–20 kb	100–2000 kb
Stosowanie izotopów	izotopowo i nieizotopowo	nieizotopowo izotopowo jedynie dla mikrosatelitów
Sondy Primery	MZ1.3 33.3 33.15 F10 GTG MS31 MS43A	D1S80 D17S30 ApoB DXS52 Humthol Col2A1

Własne obserwacje i wyniki wspólnego studium potwierdzają wysoką wartość analizy wielopunktowej. Na wynik uzyskany tą metodą nie wpływają drobne różnice metodyczne występujące w poszczególnych pracowniach. Najważniejsze jest, że metoda zdecydowanie rozdziela przypadki potwierdzenia i wykluczenia ojcostwa na dwie odrębne grupy, nie zawierające wspólnych obszarów.

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA A STANDARYZACJA BADAŃ

W ostatnim czasie coraz więcej pracowni skupionych wokół instytutów badawczych lub laboratoriów prywatnych przystępuje do diagnostyki molekularnej.

larnej. Uzyskiwane wyniki służyć mają często w doborze terapii, mają potwierdzić lub wykluczyć nosicielstwo choroby oraz zidentyfikować uszkodzony gen. Wzrost zainteresowań badaniami molekularnymi wiąże się przede wszystkim z możliwością uzyskania wyników reakcją PCR. W naszym kraju nie ma systemu atestacji i standaryzacji badań molekularnych. Dla przykładu w krajach Europy Zachodniej powstały instytucje nadzorujące w ciągły sposób jakość wykonywanych badań. Szczególnie wyraźnie zauważyć można działanie atestacyjne w badaniach z zakresu medycyny sądowej i kryminalistyki nadzorowane w Europie przez EDNAP, a w Niemczech przez GDNAP. Powstaje w ten sposób sieć laboratoriów wykonujących badanie na najwyższym poziomie. W Polsce atestacja tego rodzaju aczkolwiek zapoczątkowana, nie rozwija się i spotyka się z ogólną niechęcią.

Podobnie laboratoria diagnostyczne zajmujące się badaniem chorób genetycznych tworzą grupy robocze. Przykładem może być mukowiscydoza (CFTR), dla której utworzono międzynarodowe konsorcjum standaryzujące wykrywanie mutacji i oznaczanie nosicielstwa. W kraju powstała ostatnio grupa robocza mukowiscydozy, która stanowi przedłużenie działania międzynarodowego konsorcjum. Inicjatywy w tym aspekcie wydają się być szczególnie cenne.

POLYMORPHIC DNA SEQUENCES AND THEIR APPLICATION IN PATERNITY TESTING

Summary

Characteristics of polymorphic sequences of DNA, especially satellite, minisatellite and microsatellite sequences are presented. Own experience from the use of multi and single locus analysis of DNA in paternity testing has been compared with the results of research in other laboratories. Critical points of both types of analysis are discussed.

LITERATURA

- ALI S., MULLER C. R., EPPLEN J. T., 1986. *DNA fingerprinting by oligonucleotide probes specific for simple repeats*. Hum. Genet. 74, 239-243.
- BECKMAN J. S., WEBER J. L., 1992. *Survey of human and rat microsatellites*. Genomics 12, 627-631.
- BELL G. I., SELBY M. J., RUTTER W. J., 1982. *The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences*. Nature 295, 31-35.
- BOHM I., KRAWCZAK M., NURNBERG P., HAMPE J., HUNDRIESER J., POCHE H., PETERS C., SŁOMSKI R., KWIATKOWSKA J., NAGY M., POPPERL A., EPPLEN J. T., SCHMIDTKE J., 1992. *Oligonucleotide DNA fingerprinting: results of a multi-center study on reliability and validity*. In *DNA Fingerprinting*, red. S. D. J. PENA, R. CHAKRABORTY, J. T. EPPLEN and A. J. JEFFREYS, Birkhauser Verlag.
- BOHM I., KRAWCZAK M., NURNBERG P., HAMPE J., HUNDRIESER J., POCHE H., PETERS C., SŁOMSKI R., KWIATKOWSKA J., NAGY M., POPPERL A., EPPLEN J. T., SCHMIDTKE J., 1993. *Paternity testing with oligonucleotide probe (CAC)5/(GTG)5 a multi-center study*. Forensic Science International 59, 101-107.
- BOYLAN K. B. M., TAKAHASHI N., DIAMOND M., HOOD E., PRUSINER S. B., 1987. *DNA length polymorphism located 5' to the human myelin basic gene*. Am. J. Hum. Genet. 40, 387-400.
- BRITTEN R. J., KOHNE D. E., 1968. *Repeated sequences in DNA*. Science 161, 529-540.
- BUDOWLE B., 1993. *VNTR population data from various reference groups and the significance of application to identity testing*. W: PENA S. D. J., CHAKRABORTY R., EPPLEN J. T., JEFFREYS A. J. (red.), *DNA Fingerprinting: state of the Science*. Basel: Birkhauser Verlag.
- BUDOWLE B., CHAKRABORTY R., GIUSTI A. M., EISENBERG A. J., ALLEN R. R. C., 1991. *Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE*. Am. J. Hum. Genet. 48, 137-144.

- CAPON D. J., CHEN E. Y., LEVINSON A. D., SEEBURG P. H., GOEDDEL D. V., 1983. *Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue*. Nature 302, 33-37.
- CHAKRABORTY R., SHOW M., SCHULL W. J., 1974. *Exclusion of paternity: The current state of the art*. Am. J. Hum. Genet. 26, 477-488.
- ECONOMOU E. P., BERGEN A. W., WARREN A. L., ANTONARAKIS S. E., 1990. *The polydeoxyadenylate tract of Alu repetitive elements is polymorphic in the human genom*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2951-2954.
- EDWARDS A., CIVITELLO A., HAMMOND H. A., CASKEY C. T., 1991. *DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats*. Am. J. Hum. Genet. 49, 746-756.
- EPPLEN J. T., MCCARREY J. R., SUTOU S., OHNO S., 1982. *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, 79, 3798-3802.
- EVETT I. W., WERRET D. J., BUCKLETON J. S., 1989a. *Paternity calculations from DNA multilocus profiles*. J. Forensic. Sci. Soc. 29, 249-254.
- EVETT I. W., WERRET D. J., SMITH A. F. M., 1989b. *Probabilistic analysis of DNA profiles*. J. Forensic. Sci. Soc., 29, 191-196.
- HIGGS D. R., WAINSCOT J. S., FLINT J., HILL A. V. S., THEIN S. L., NICHOLS R. D., TEAL H., AYYUB H., PETO T. E. A., FALUSI A. G., JARMAN A. P., CLEGG J. B., WEATHERALL D., 1986. *Analysis of the human globin gene cluster reveals a highly informative genetic locus*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83, 5165-5169.
- JARUZELSKA J., SLOMSKI R., 1990. *Molecular basis of phenylketonuria*. Postępy Biochemii 36, 24-31.
- JEFFREYS A. J., WILSON V., THEIN S. W., 1985a. *Hypervariable „minisatellite” region in human DNA*. Nature 314, 67-73.
- JEFFREYS A. J., WILSON V., THEIN S. W., 1985b. *Individual-specific „fingerprints” of human DNA*. Nature 316, 76-79.
- JEFFREYS A. J., NEUMANN R., WILSON V., 1990. *Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis*. Cell 60, 473-485.
- JEFFREYS A. J., MACLEOD A., TAMAKI K., NEIL D. L., MONCKTON D. G., 1991. *Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing*. Nature 354, 204-209.
- JUNGEMAN M., SLOMSKI R., 1987. *Genetic diseases — diagnosis using molecular probes and restriction fragments length polymorphism*. Kosmos 36, 201-212.
- JUNGEMAN M., SLOMSKI R., 1990. *In vitro enzymatic amplification of specific DNA sequences*. Postępy Biochemii 36, 14-21.
- KASAI K., NAKAMURA Y., WHITE R., 1990. *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., 35, 1196-1200.
- KNOTT T. J., WALLIS S. C., PEASE J., POWELL L. M., SCOTT J., 1986. *A hypervariable region 3' to the apolipoprotein B gene*. Nucl. Acid. Res. 14, 9215-9216.
- KNOWLTON R. G., BROWN J. C., BARKER D., SCHUMM J. W., MURRAY C., TAKVORIAN T., RITZ J., DONNIS-KELLER H., 1986. *Use of highly polymorphic probes for genotype analysis bone marrow transplantation*. Blood 68, 378-385.
- KRAWCZAK M., BOCKEL B., 1993. *The formal analysis of multilocus DNA fingerprints*. W: DNA Fingerprinting, red. S. D. J. PENA, R. CHAKRABORTY, J. T. EPPLEN and A. J. JEFFREYS, Birhauser Verlag, 1992.
- KWIATKOWSKA J., SLOMSKI R., 1992. *DMD gene — the largest human gene*. Postępy Biochemii 38, 49-55.
- LITT M., LUTY J. A., 1989. *A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene*. Am. J. Hum. Genet. 44, 397-401.
- NAKAMURA Y., JULIER C., WOLFF R., HOLM R., O'CONNELL P., LEPPERT M., WHITE R., 1987. *Characterization of a human „midisatellite” sequence*. Nucleic Acids Res., 15, 2537-2547.
- NAKAMURA Y., CARLSON M., KRAPCHO K., KANAMORI M., WHITE R., 1988. *New approach for isolation of VNTR markers*. Am. J. Hum. Genet. 43, 854-859.
- NIEMAN-SEYDE S., SLOMSKI R., RINISLAND F., ELLERMAYER U., KWIATKOWSKA J., REISS J., 1992. *Molecular genetic analysis of 67 patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy*. Hum. Genet. 90, 65-70.
- PENA S. D. J., CHAKRABORTY R., EPPLEN J. T., JEFFREYS A. J., 1993. *In DNA Fingerprinting*, red. S. D. J. PENA, R. CHAKRABORTY, J. T. EPPLEN and A. J. JEFFREYS, Birhauser Verlag, 1992.

- ROYLE N. J., CLARKSON R. E., WONG Z., JEFFREYS A. J., 1988. *Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of human autosoms*. Genomics 3, 352-360.
- SILVA A. J., JOHNSON J. P., WHITE R., 1987. *Characterization of a highly polymorphic region 5' to JH in the human immunoglobulin heavy chain*. Nucl. Acid. Res., 15, 3845-3857.
- SŁOMSKI R., ZIĘTKIEWICZ E., 1987. *DNA recombination techniques in human genetics*. Postępy Biochemii 33, 445-465.
- SŁOMSKI R., JUNGGERMAN J., KRASZEWSKI A., HORST-SIKORSKA W., 1989. *In vitro amplification of selected sequences of human genome*. Biotechnologia 2, 74-84.
- SŁOMSKI R., CHLEBOWSKA H., REISS J., 1992. *Application of the polymerase chain reaction in clinical diagnostics*. Postępy Biochemii 38, 75-80.
- SŁOMSKI R., KWIATKOWSKA J., CHLEBOWSKA H., 1993. *Application of molecular biology techniques in diagnosis of human diseases*. Biotechnologia 4, 125-131.
- SMITH J. C., ANWAR R., RILEY J., JENNER D., MARKHAM A. F., JEFFREYS A. J., 1990a. *Highly polymorphic minisatellite DNA probes. Further evaluation for individual identification and paternity testing*. Journal of a Forensic Society, 30, 19-32.
- SMITH J. C., NEWTON C. R., ALVES A., ANWAR R., JENNER D., MARKHAM A. F., 1990b. *Highly polymorphic minisatellite sequences: Allele frequency and mutation rates for five locus specific probes in Caucasian population*. J. For. Sci. Soc., 30, 19-32.
- STALLINGS R. L., FORD A. F., NELSON D., TORNEY D. C., HILDEBRAND C. E., MOYSIS R. K., 1991. *Evolution and distribution of (GT)_n sequences in mammalian genomes*. Genomics, 10, 807-815.
- STOKER N. G., CHEAH K. S. E., GRIFFIN J. R., POPE F. M., SOLOMON E., 1985. *A highly polymorphic region 3' to the human type II collagen gene*. Nucl. Acid. Res. 13, 4613-4622.
- TAUTZ D., 1989. *Hypervariability of simple sequences as a general source of genetic variation*. Nucl. Acid. Res. 17, 6463-6471.
- TAUTZ D., 1993. *Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences*. W: DNA Fingerprinting, red. S. D. J. PENA, R. CHAKRABORTY, J. T. EPPLER and A. J. JEFFREYS, Birhauser Verlag, 1992.
- VASSART G., GEORGES M., MONSIEUR M., BROCAS H., LEQUARRE A. S., CHRISTOPHE D., 1987. *A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA*. Science 235, 683-684.
- VERGNAUD G., MARIAT D., ZOROASTRO M., LAUTHIER V., 1989. *Detection of single and multiple polymorphic loci by synthetic tandem repeats of short oligonucleotides*. Electrophoresis 12, 134-140.
- VOGT P., 1990. *Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on highly conserved „chromatin folding code”*. Hum. Genet. 84, 301-336.
- WEBER J. L., MAY P. E., 1989. *Abundant class of human polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction*. Am. J. Hum. Genet. 44, 388-396.
- WEISSENBACH J., GYAYPAY G., DIB C., VIGNAL A., MORISETTE J., MILASSEAU P., VAYSSEIZ G., LATHROP M., 1992. *A second-generation linkage map of the human genome*. Nature 359, 794-801.
- WONG Z., WILSON V., PATEL I., JEFFREYS A. J., 1987. *Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA*. Annals of Human Genetics 51, 269-288.
- ZULIANI G., HOBBS H. H., 1990. *A high frequency of length polymorphisms in repeated sequences adjacent to Alu sequences*. Am. J. Hum. Genet. 46, 963-969.