

PREGLEDNI ČLANCI REVIEW ARTICLES

Institut za sudsku medicinu, Novi Sad

Pregledni članak
Review article

UDK 340.66:[347.63:577.113.1

DOI: 10.2298/MPNS0606241V

ANALIZA MIKROSATELITSKIH MARKERA DNA KAO METODE VEŠTAČENJA SPORNOG OČINSTVA

MICROSATELLITE DNA ANALYSIS AS A TOOL FOR FORENSIC PATERNITY TESTING (DNA PATERNITY TESTING)

Igor VESELINOVIĆ

Sažetak - Primenom dosadašnjih metoda veštačenja spornog očinstva, kao što su serološka ispitivanja krvnih antigena ili HLA-tipizacija tkiva, osoba muškog pola eventualno je mogla biti isključena kao biološki otac, dok pozitivan nalaz, koji sa dovoljnom verovatnoćom govori u prilog tezi da su presumptivni i biološki otac deteta ista osoba, nije mogao biti dobijen. Hipervarijabilnost pojedinih naslednih osobina omogućila je primenu analize DNA u veštačenjima spornog očinstva, čime je učinjen suštinski pomak, jer je, direktnim uvidom u naslednu materiju, sporno očinstvo moglo biti "praktično dokazano", što podrazumeva rezultat koji sa verovatnoćom većom od 99,99% potvrđuje sporno očinstvo određenog muškarca. Mikrosatelitski markeri građeni su od uzastopno ponovljenih sekvenci osnovne repetitivne jedinice, dužine 2-6 parova nukleotida. Zahvaljujući varijacijama broja ponavljanja repetitivne jedinice, većina mikrosatelitskih markera pokazuje visoki stepen polimorfizma, koji je moguće ispitati PCR tehnologijom, što omogućava primenu ove vrste analiza kako u kriminalistici i slučajevima forenzičke identifikacije, tako i u veštačenjima spornog roditeljstva.

Ključne reči: DNK + analiza; Očinstvo; Sudska medicina; Mikrosatelitske repetitivne sekvence

Prema rezultatima nedavno završenog istraživanja američkog Nacionalnog instituta za ispitivanje humanog genoma (*National Human Genome Research Institute*) i Američkog vladinog ureda za energiju (*U.S. Department of Energy*), humani genom sadrži značajno manji broj gena nego što se pretpostavljalo, i taj broj iznosi svega oko 30 000. Ukoliko se ima u vidu činjenica da je prosečna dužina gena oko 1000 - 1500 parova nukleotida, dužina svih kodirajućih sekvenci humanog genoma iznosi oko 300-450 miliona baznih parova, što čini manje od 5% ukupne nuklearne DNA. Nekodirajućim delom obuhvaćeni su ekstragenska DNA, s jedinstvenim i repetitivnim sekvencama, te pseudogeni, introni i genski fragmenti. U nekodirajućim delovima DNA nalaze se i markeri značajni za humanu identifikaciju.

Godine 1985. britanski genetičar Alec Jeffreys otkrio je da se u pojedinim regijama DNA određene sekvence nukleotida ponavljaju, a da je broj ponavljanja repetitivne jedinice individualan, te da je određivanjem dužina ovih regija moguće razlikovati genetski materijal različitih osoba. Regije su nazvane VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) ili minisatelitska DNA, a metod analize zasnivao se na delovanju restriktivnih enzima na krajeve segmenta građenog od repetitivnih sekvenci po čemu je i dobio ime - RFLP (*Restriction Fragments Length*

Polymorphism) ili polimorfizam dužina restriktivnih fragmenata. Uprkos visokom stepenu polimorfizma i velikoj moći diskriminacije minisatelitskih markera, RFLP metod zahtevao je veliki utrošak vremena i relativno veliku količinu intaktne DNA. Zbog toga se pojavila potreba za metodom koja će biti dovoljno specifična, ali brža i efikasnija pri radu sa minimalnom količinom DNA materijala. Osamdesetih godina XX veka predstavljena je metoda koja je ispunjavala sve postavljene uslove. Nazvana je PCR ili *Polymerase Chain Reaction* (Kary Mullis) - lančana reakcija polimeraze, a markeri u čijem je ispitivanju metoda našla svoju najznačajniju forenzičku primenu dobili su naziv STRs (*Short Tandem Repeats*), SSR (*Simple Sequence Repeats*) ili mikrosatelitska DNA [1,2].

STR-markeri građeni su od uzastopno ponovljenih sekvenci osnovne repetitivne jedinice, dužine 2-6 parova nukleotida, koje se ponavljaju različit broj puta, što dovodi do pojave različitih dužina odgovarajućih segmenata DNA. Iako je stepen polimorfizma mikrosatelitskih markera relativno nizak u poređenju s minisatelitima, čije su repetitivne jedinice duge i više desetina baznih parova, veliki broj mikrosatelita prisutnih u genomu, jednostavna amplifikacija i mogućnost istovremene analize većeg broja markera (multipleks PCR), kao i efikasnost metode pri radu s minimalnim

količinama, čak i delom degradirane DNA, učinili su mikrosatelit markerima prvog izbora u forenzičkim DNA analizama [3].

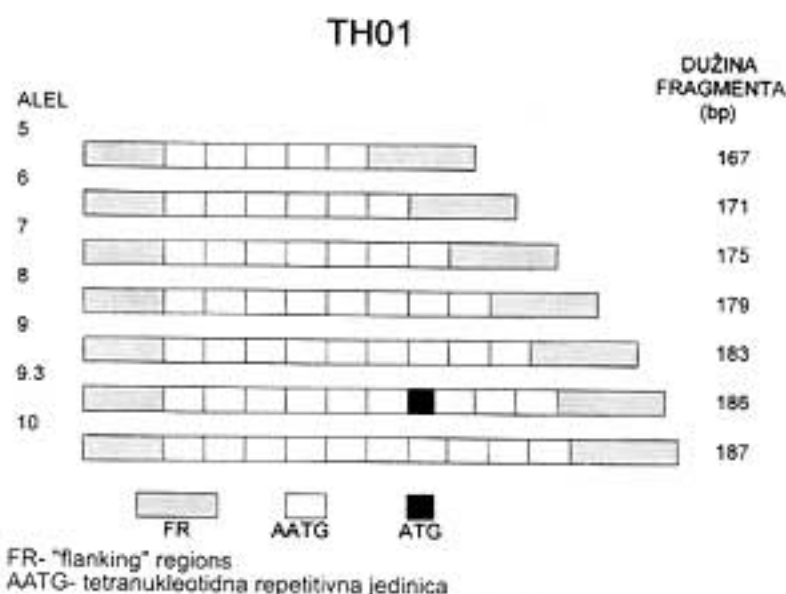
Sa većim brojem alela prisutnih na određenom genskom lokusu raste i broj različitih genotipova u populaciji. Generalno uzevši, n alela određenog markera rezultiraće sa n homozigotnih genotipova i $n*(n-1)/2$ heterozigotnih varijanti prisutnih u populaciji. Otuda, marker sa svega 10 alela u populaciji će biti prisutan u 55 varijanti, a kombinacijom 10 markera sa po 10 alela moguće je dobiti oko $2,5 \times 10^{17}$ različitih genotipova. Zbog toga je sasvim jednostavno zaključiti da, kao što je slučaj i sa kodirajućim delovima DNA, izuzev u slučajevima jednojajčanih blizanaca, ne postoje dve osobe sa identičnim strukturama STR markera.

Kao izvor genomske DNA u veštačenjima roditeljstva, po pravilu, služi propisno uzet uzorak krvi ili bris sluzokože usne duplje. Ukoliko navedeni uzorci nisu dostupni (kod dokazivanja srodstva *post mortem*), izolaciju DNA moguće je izvršiti i iz bilo kog drugog tkiva - kost, mišić, zub, tkivo u parafinskom bloku i dr. [4,5].

Izolovana DNA amplifikuje se metodom PCR, koji predstavlja proces ciljane replikacije izabranih segmenata DNA u strogo kontrolisanim uslovima, dodavanjem optimalnih količina komponenti u reakcionu smešu, uz upotrebu termostabilne DNA-polimeraze i ciklične promene temperature. Nakon svakog PCR-ciklusa nastaje dvostruko veća količina DNA od početne, te su nakon standardnih 25-30 PCR-ciklusa u reakcionoj smeši prisutni milioni identičnih kopija početnog, originalnog molekula, što predstavlja količinu više nego dovoljnu za dalje analize.

Fragmenti DNA nastali tokom PCR amplifikacije razdvajaju se kapilarnom elektroforezom, što podrazumeva kretanje DNA-molekula pod uticajem električnog polja, kroz stakleni kapilar ispunjen specifičnim polimernim gelom [6,7]. Zahvaljujući svojim dimenzijama, kraći fragmenti kreću se brže kroz medijum, dok duži aleli nailaze na veći otpor sredine i putuju sporije. Prolazak svakog molekula DNA ispred detektora predstavljen je na elektroferogramu u vidu pika. Broj pikova u elektroferogramu u području jednog markera može biti 1 ili 2, što zavisi od toga da li je osoba homo- ili heterozigot na ispitivanom lokusu. Određivanje dužine fragmenata vrši se poređenjem položaja dobijenih pikova sa standardom, odnosno, elektroferogramom dobijenim elektroforezom fragmenata DNA poznate dužine.

Prema međunarodnim preporukama i propisima, neophodno je da ispitivanjem bude obuhvaćeno najmanje 12 međusobno nezavisnih lokusa s poznatom učestalošću mutacija, na najmanje 10 različitih hromozoma. Postizanje verovatnoće veće od 99,99% odgovara izrazu "praktično dokazano očinstvo", dok je za isključenje očinstva neophodno postojanje najmanje tri isključujuće konstelacije alela [8].



Slika 1. Shematski prikaz strukture TH01 mikrosatelitskog lokusa

Fig. 1. Schematic representation of TH01 microsatellite loci

Pored neophodnosti ispunjavanja tehničkih predušlova, što podrazumeva adekvatan prostor, opremu validiranu za ovu vrstu analiza, validaciju osoblja i redovno sprovođenje spoljašnje kontrole rada od strane najmanje jedne od međunarodnih institucija koje se bave ovom problematikom, kao nezaobilazni zadatak, pred svaku laboratoriju koja se bavi forenzičkom DNA analizom, postavlja se izrada populacione studije, koja predstavlja podatke o frekvencijama alela genskih markera čije se ispitivanje vrši, među stanovništvom koje nastanjuje područje delovanja laboratorije. Imajući u vidu činjenicu da svaka populacija pokazuje manje ili veće specifičnosti u distribuciji alela, rezultati studije sa jednog područja ne mogu i ne smeju biti automatski primenjeni pri statističkoj obradi i interpretaciji rezultata u drugoj sredini. Razlike u učestalosti pojedinih alela mogu biti veoma značajne, ne samo između različitih rasa, već i u okviru iste etničke grupe [9].

Na osnovu podataka iz populacione studije sprovedene među stanovništvom Vojvodine, te statističke obrade rezultata i vrednosti forenzičkih parametara, može se zaključiti da analiza STR markera može biti veoma uspešno korišćena u našoj sredini, kako u kriminalistici i slučajevima forenzičke identifikacije, tako i u slučajevima veštačenja spornog roditeljstva. Podaci o frekvencijama alela standardno ispitivanih mikrosatelitskih markera u vojvođanskoj populaciji koriste se pri statističkim proračunima i interpretaciji rezultata analiza koje se vrše u Institutu za sudsku medicinu u Novom Sadu [10].

Zaključak

Za razliku od dosadašnjih metoda veštačenja, analiza DNA omogućava direktan uvid u samu naslednu materiju, te po prvi put omogućava ne

samo isključivanje, nego i praktično dokazivanje spornog očinstva, s verovatnoćom većom od 99,99%, koja ukazuje da su presumptivni i biološki otac ista osoba.

Međunarodni standardi, pored validacije laboratorijskog prostora, opreme i osoblja, podrazumevaju i permanentnu spoljašnju kontrolu rada laboratorije.

Frekvencije pojedinih naslednih osobina razlikuju se ne samo između rasnih tipova, nego i u okviru iste etničke grupe, te svaka laboratorija koja se bavi analizom DNA mora raspolagati podacima o genskim karakteristikama vlastite populacije.

Literatura

1. Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, Keyte J. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cell Nucleic Acids Res 1988;16:10953-71.
2. Sprecher CJ, Puers C, Lins AM, Schumm JW. General approach to analysis of polymorphic short tandem repeat loci Bio Techniques 1996;20:266-76.
3. Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P. Variation in short tandem repeat sequences - a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers Int J Legal Med 1994;107:13-20.
4. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988;16:1215.
5. Cattaneo C, Craig OE, James NT, Sokol RJ. Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences. J Forensic Sci 1997;42:1126-35.
6. Lazaruk K, Walsh PS, Oaks F, Gilbert D, Rosenblum BB, Menchen, S, et al. Genotyping of forensic short tandem repeat (STR) systems based on sizing precision in a capillary electrophoresis instrument. Electrophoresis 1998;19:86-93.
7. Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM, Brown AL, Budowle B. Validation of STR typing by capillary electrophoresis. J Forensic Sci 2001;46:661-76.
8. Chakraborty R, Stivers DN. Paternity exclusion by DNA markers: effects of paternal mutations J Forensic Sci 1996;41:671-7.
9. Butler JM, Schoske R, Vallone PM, Redman JW, Kline MC. Allele frequencies for 15 autosomal STR loci on U.S. Caucasian, African, American, and Hispanic populations. J Forensic Sci 2003;48:908-11.
10. Veselinović I, Kubat M, Furač I, Škavić J, Martinović-Klarić I, Tasić M. Allele frequencies of the 15 AmpFISTR Identifier loci in the population of Vojvodina Province, Serbia and Montenegro. Int J Legal Med 2004;118:184-6.

Summary

Microsatellite analysis

By using serological or HLA-testing, the alleged father can be excluded as the biological father, but, regardless of the degree of probability, positive paternity results cannot be obtained without DNA testing. According to the results of the National Human Genome Project, human genome consists of approximately 30.000 genes. The vast majority of human DNA is not organized in genes and has no genetic expression or visible function. Non-coding DNA contains genetic markers important for human identification. Short tandem repeats, or STRs, are a class of microsatellites consisting of tandemly repeated sequences of 2 to 6 base pair length monomers. Most of the microsatellites show a high degree of polymorphism, which can

be evaluated by PCR technique, and used in criminalistics, forensic identification and parentage testing. A source of DNA in parentage testing are blood samples or buccal swabs which are routinely used. Amplification of isolated DNA can be performed in 25-30 cycles by PCR, and fragments are separated by capillary electrophoresis.

Conclusion

The probability of paternity of 99.99% or higher corresponds to the paternity "practically proven", indicating that the alleged father is the biological father. Such results can be obtained only by DNA testing. DNA-testing laboratories are required to conduct validation of laboratory facilities, equipment and staff and are subject to permanent control by the society.

Key words: DNA + analysis; Paternity; Forensic Medicine; Microsatellite Repeats

Rad je primljen 18. I 2005.

Prihvaćen za štampu 21. II 2005.

BIBLID.0025-8105(2006):LIX:5-6:241-243.