

Wojciech Łuczak  
Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej  
Wydział Biologii  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

## **Opracowanie zestawu polimorficznych markerów STR do genotypowania ludzi oraz jego wdrożenie do analiz pokrewieństwa w dalszych relacjach rodzinnych**

### **Streszczenie rozprawy doktorskiej**

Analiza długości sekwencji mikrosatelitarnych, czyli krótkich powtórzeń tandemowych (ang. STR – Short Tandem Repeats), jest jedną z najważniejszych metod stosowanych w genetyce sądowej, w tym w badaniach biologicznego pokrewieństwa. Jej powszechność stosowania wynika z wysokiej informatywności, czułości oraz możliwości badania zdegradowanego DNA. Dodatkowo, metoda ta charakteryzuje się niskim kosztem jednostkowym analizy i krótkim czasem realizacji badań. Rutynowa analiza loci STR w laboratoriach genetyczno-sądowych opiera się na technice multipleks-PCR, wykorzystującej fluorescencyjnie znakowane startery, oraz na elektroforezie kapilarnej, która umożliwia określenie długości zamplifikowanych alleli. W badaniach kryminalistycznych i analizach pokrewieństwa najczęściej stosuje się technologię pozwalającą na jednoczesną analizę dwudziestu loci STR z systemu CODIS (ang. Combined DNA Index System) oraz dodatkowych loci STR, takich jak SE33, PENTA D i PENTA E, przy użyciu komercyjnych zestawów odczynników. Analiza dwudziestu loci STR systemu CODIS jest zazwyczaj wystarczająca w stosunkowo prostych sprawach dotyczących badania biologicznego ojcostwa lub macierzyństwa, jednak okazuje się być niewystarczająco informatywna w przypadku badania pokrewieństwa w relacjach pokrewieństwa drugiego i trzeciego stopnia.

Celem niniejszego doktoratu wdrożeniowego było opracowanie metody Kinfinder do badania biologicznego pokrewieństwa w dalszych relacjach rodzinnych. Metoda miała zostać wdrożona w Laboratorium Diagnostyki Molekularnej GenMed, w związku z czym musiała opierać się na technologii reakcji multipleks-PCR oraz elektroforezy kapilarnej. Takie podejście pozwoliłoby na stosowanie metody przez firmę bez konieczności ponoszenia dodatkowych kosztów inwestycyjnych w nową aparaturę, przestrzeń laboratoryjną oraz w szkolenia pracowników.

Projekt opracowania metody Kinfinder obejmował analizę bioinformatyczną genomu ludzkiego, w celu identyfikacji 150-200 najbardziej polimorficznych loci STR, następnie zaprojektowanie starterów do reakcji PCR do amplifikacji każdego z wybranych loci i

przeprowadzenie laboratoryjnych badań przesiewowych loci STR pozwalających na oszacowanie heterozygotyczności loci w populacji polskiej. W kolejnym etapie wybrano 50 najbardziej polimorficznych loci i opracowano dwie reakcje multipleks-PCR do genotypowania ludzkiego DNA w zakresie wybranych loci STR. Po zaprojektowaniu i walidacji metody, dysponując możliwością analizy 50 loci w dwóch reakcjach multipleks-PCR, przeprowadzono badania populacyjne mające na celu wyznaczenie częstości występowania alleli każdego locus w populacji polskiej. Badania opisane w niniejszej pracy objęły także sekwencjonowanie loci w celu powiązania długości sekwencji tandemowo powtórzonej z długością amplikonów, a także objęły stworzenie drabiny allelicznej oraz odczynnika do kalibracji analizatora genetycznego. Badania populacyjne potwierdziły bardzo wysoką polimorficzność opracowanych 50 loci STR. Ich średnia heterozygotyczność wynosiła 88,07% co w porównaniu ze średnią heterozygotycznością loci CODIS wynoszącą w polskiej populacji 78,95% jest wyraźnie wyższą wartością. Najbardziej polimorficzne loci w zestawie Kinfinder (D8A26, D15L495, D13S742) cechowały się heterozygotycznością odpowiednio 93,45%, 93,53%, 93,9% co odpowiada najbardziej polimorficznemu locus STR wykorzystywanego w genetyce sądowej (SE33), którego heterozygotyczność w populacji polskiej wynosi od 93,4% do 95,4% w zależności od źródeł literaturowych.

Wyniki badań wskazują, że wykorzystane dane wstępne oraz opracowana od podstaw metoda szacowania polimorfizmu loci STR pozwoliły na weryfikację heterozygotyczności wybranych loci w populacji polskiej. Zgodnie z założeniami, potwierdzono, że heterozygotyczność części loci STR jest wyższa niż ta zgłoszona w bazach projektu 1000 Genomes oraz w bazach STRCatalog i WebSTR, co uwidocznilo ograniczenia technologii sekwencjonowania krótkich odczytów zastosowanej w projekcie 1000 Genomes w analizie polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych w genomie ludzkim.

Wyniki analiz statystycznych badań pokrewieństwa w różnych relacjach rodzinnych potwierdziły wysoką informatywność metody Kinfinder i jej przydatność zwłaszcza w badaniach pokrewieństwa drugiego i trzeciego stopnia. Zgodnie z założeniami doktoratu wdrożeniowego, metoda Kinfinder została włączona do standardowych procedur Laboratorium Diagnostyki Molekularnej GenMed i została już zastosowana w ponad trzydziestu badaniach pokrewieństwa w tym w sprawach sądowych.