

długości alleli mikrosatelitarnych dla każdego niepowtarzalnego genotypu, zostaną wykorzystane do obliczeń statystycznych. Analiza wyników będzie polegała na obliczeniu zróżnicowania genetycznego populacji, obserwowanej ( $H_o$ ) i oczekiwanej ( $H_e$ ) heterozygotyczności, odchyłań od równowagi Hardy-Weinberga (RHW), nierównowagi sprzężeniowej, indeksu zróżnicowania genetycznego między populacjami (FST), średniej liczby osobników migrujących wymienionych między populacjami w jednym pokoleniu (Nem), oszacowaniu inbredu w każdej populacji oraz ustaleniu dystansu genetycznego między populacjami. Celem projektu jest zbadanie struktury genetycznej wewnątrz i pomiędzy populacjami cietrzewia, występującymi na terenie północno-wschodniej Polski, na podstawie polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych DNA i zaproponowanie wytycznych dla prawidłowej ochrony i zachowania cietrzewia na całym obszarze jego występowania w tym regionie kraju.

**Literatura:** 1. Jaszczak K., Parada R., 1999 – *Animal Sciences Papers and Reports* 17, 3, 115-121. 2. Jaszczak K., Parada R., Jasz-

czak J., 2002 – *Animal Science Papers and Reports* 20, 3, 74-76. 3. Jaszczak K., Parada R., Sacharczuk M., 2003 – *Journal of Animal and Feed Sciences* 12, 835-839. 4. Jaszczak K., Książkiewicz J., Parada R., Sacharczuk M., 2005 – *Journal of Animal and Feed Sciences* 14, 571-575. 5. Jaszczak K., Malewski T., Parada R., Malec H., 2006 – *Journal of Animal and Feed Sciences* 16, 463-469. 6. Keszka J., Jaszczak K., 1996 – *Journal of Applied Genetics* 37, 4, 367-372. 7. Parada R., Jaszczak K., Sysa P., Jaszczak J., 1996 – *Prace i Mat. Zoot.* 48, 71-81. 8. Sacharczuk M., Sadowski B., Parada R., Świergiel A.H., Jaszczak K., 2005 – *Animal Science Papers and Reports* 23, 2, 129-138. 9. Sazanov A.A., Romanov M.N., Wardęcka B., Sazanov A.L., Korczak M., Smirnov A.F., Jaszczak K., Dodgson J., 2005 – *Animal Genetics* 36, 161-163. 10. Sazanov A.A., Stekolnikova V.A., Korczak M., Sazanov A.L., Jaszczak K., Zięba G., Malewski T., 2007 – *Poultry Science* 87, 202-205. 11. Wardęcka B., Olszewski R., Jaszczak K., Zięba G., Pierzchała M., 2003 – *Czech Journal of Animal Science* 48, 97-105. 12. Wardęcka B., Jaszczak K., Parada R., Korczak M., Zięba G., 2005 – *Journal of Animal and Feed Sciences* 14, 561-570. 13. Wardęcka B., Jaszczak K., Pierzchała M., Parada R., Korczak M., 2004 – *Journal of Applied Genetics* 45(1), 61-71.

## Poznawcze i aplikacyjne zastosowania wyników badań mtDNA

**Beata Prusak, Barbara Gralak,  
Ewa Karpiniak, Irmina Bieńkowska,  
Grzegorz Grzybowski**

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

Po przełomowym odkryciu obecności DNA w mitochondriach, szeroki nurt badań genetycznych doprowadził do wyodrębnienia się problematyki określanej mianem mitochondrialnej genomiki porównawczej roślin i zwierząt.

Struktura genomu mitochondrialnego (mtDNA) u różnych gatunków jest bardzo podobna, lecz różni się zasadniczo od organizacji DNA jądrowego – mtDNA ma fizyczną postać kolistej, kowalencyjnie zamkniętej, dwuniciowej cząsteczki. Dwie nici mtDNA charakteryzują się odmiennym składem zasad – nić bogata w reszty guaniny określana jest jako nić ciężka (H), nić bogata w reszty cytozyny nazywana jest nicią lekką (L). Organizacja mtDNA jest bardzo oszczędna i charakteryzuje ją duża zwartość – geny nie zawierają intronów, a poza tzw. regionem kontrolnym (pętlą D), zawierającym miejsce inicjacji replikacji nici H oraz promotory dla transkrypcji nici H i L (odpowiednio PH i PL), w cząsteczce brak odciników niekodujących. Sekwencja genomu mitochondrialnego człowieka, z właściwą dla niej numeracją nukleotydów (1-16569), stosowana jest jako wzorzec porównawczy w badaniach kolejnych genomów mtDNA i stąd określana jest mianem sekwencji referencyjnej.

W genomie mitochondrialnym obecnych jest zaledwie 37 genów (kodujących cząsteczki rRNA: 12S i 16S, 22 cząstecz-

ki tRNA oraz 13 białek będących składnikami enzymatycznych kompleksów fosforylacji oksydacyjnej). Szczególnie duże znaczenie dla analiz filogenetycznych ma fakt dziedziczenia mtDNA w linii matczynej oraz brak rekombinacji. Wprawdzie plemniki ssaków zawierają niewielką ilość mtDNA, lecz po wnikięciu do komórki jajowej ojcowski mtDNA zostaje naznaczony poprzez ubiquitynację i ulega degradacji. System selektywnej degradacji ojcowskich mitochondriów ssaków, którego poznanie uznawane jest za jedno z najbardziej doniosłych odkryć w biologii, ma charakter wewnątrzgatunkowy i działa bardzo efektywnie.

Wspomniane cechy oraz fakt, że występowanie mutacji w tzw. rejonie kontrolnym (określanym także jako pętla D) około dziesięciokrotnie przewyższa średnią częstość mutacji w DNA jądrowym, unaocznia dużą przydatność polimorfizmu sekwencji mtDNA jako markera w badaniach z dziedziny genetyki ewolucyjnej oraz w różnorodnych analizach o charakterze poznawczym i aplikacyjnym. Zarówno ze względu na możliwość wzbogacenia wiedzy w dyscyplinie tradycyjnie zwanej taksonomią, a także z uwagi na liczne praktyczne zastosowania tej dziedziny wiedzy, bardzo ważna jest możliwość bezbłędnej i szybkiej identyfikacji gatunków. Celowi temu służy, między innymi, światowa inicjatywa „Tworzenie Drzewa Życia” (w 2006 r. IGiHZ PAN przyłączył się do tego programu), mająca na celu wdrożenie zunifikowanego systemu identyfikacji gatunków i opisu bioróżnorodności. Standardem tego typu proponowanym dla zwierząt jest jeden z genów mitochondrialnych (COI – gen pojednostki pierwszej oksydazy cytochromowej).

Poza dziedziną taksonomii, gdzie mtDNA unikatowych okazów muzealnych można rozpoznać i scharakteryzować tylko poprzez pozyskanie śladów biologicznych, istnieje wiele innych dziedzin działalności człowieka, w których analizy polimorfizmu mitochondrialnego DNA są częstokroć jedyną dostępną metodą działania. W zależności od charakteru śladu biologicznego, dostępnego do badań oraz zależnie od ukie-

przyrody, nadzór sanitarno-weterynaryjny, higiena żywności, handel, wymiar sprawiedliwości, a zwłaszcza w:

- badaniach dowodów rzeczowych w sprawach sądowych;
- kontroli żywności i produktów pochodzenia zwierzęcego;
- w logistyce ochrony przyrody, m.in. przy zapobieganiu inwazjom gatunków obcych, ochronie zasobów genetycznych zwierząt, monitorowaniu (re)introdukcji gatunków dzikożyjących itp.

Według kryteriów genetycznych i medyczno-sądowych, za „ślad biologiczny” uznać można każdą próbkę zawierającą materiał biologiczny, przydatną do przeprowadzenia określonego testu identyfikacyjnego. Z powyższej definicji wynika, że istnieje wielka różnorodność śladów biologicznych, gdyż kryteria te spełnia każdy materiał w którym są (lub były) obecne komórki. Materiałem do analizy mogą być nie tylko komórki krwi, fragmenty tkanek, ślina, wymazy z błon śluzowych, włosy itp., lecz także śladowe ilości płynów ustrojowych.

Mitochondrialny DNA jest szczególnym związkiem charakteryzującym się niezwykle powolną degradacją, co stwarza możliwości zdobywania genetycznych informacji niemożliwych do uzyskania innymi metodami. Natura budowy mtDNA, sposób jego dziedziczenia (w linii żeńskiej), a zwłaszcza fakt, że jego źródłem mogą być szczątki kopalne lub materiał archiwalny (w którym genomowy DNA uległ już kompletnej lub daleko posuniętej degradacji) sprawia, że polimorfizm mtDNA jest obiektem szczególnego zainteresowania w dziedzinie określanej jako filogenetyka molekularna. Możliwe jest także nowe podejście badawcze nawet do zagadnień metodycznie trudnych, takich jak biologia nisz ekologicznych czy zobiektywizowane genetyczne śledzenie populacji małych ssaków, zasiedlających różne enklawy środowiskowe. Przykładem niekonwencjonalnego podejścia badawczego może tu być wykorzystanie, jako źródła DNA, tzw. wypluwek z żołądków ptaków drapieżnych. Materiał taki można z powodzeniem wykorzystać do molekularnego penetrowania i charakterystyki populacji gryzoni obsadzających daną niszę ekologiczną.

Prowadzone w IGiHZ PAN w Jastrzębcu badania polimorfizmu mtDNA, są zbieżne z działaniami na rzecz bezpieczeństwa życia i żywności, tj. priorytetami ostatnich Programów Ramowych Badań, Rozwoju Technologicznego i Prezentacji Unii Europejskiej. Zwierzęta są coraz częściej przedmiotami i narzędziami takich sytuacji, jak: wypadki drogowe, kłusownictwo, znęcanie się i zabroniony handel zwierzętami itp. W niektórych krajach, skóry psów i kotów wykorzystuje się nielegalnie w przemyśle futrzarskim, skóry egzotycznych węży są materiałem do wyrobu galanterii itp. Migracje ludności (m.in. z Azji) sprzyjają przenoszeniu do Europy nowych zwyczajów żywieniowych, takich jak: spożywanie mięsa psów, kotów, węży, itp. Nasila się międzynarodowy nielegalny handel ginącymi gatunkami zwierząt i roślin, co, według szacunków Światowego Funduszu na Rzecz Przyrody, przynosi zyski porównywalne do handlu narkotykami i bronią. Wykorzystanie tradycyjnych metod diagnostycznych do monitorowania tych zjawisk nie jest możliwe, ponieważ jedynym materiałem do badań identyfikacyjnych jest często ślad biologiczny (fragment zęba, szczątki kości lub tkanek miękkich, skóra, włosy, pióra, plamy krwi itp.). Przy ustalaniu pochodzenia takiego materiału w sprawach sądowych, rekomendowane są analizy polimorfizmu mtDNA. Na przykład, w zakresie nadzoru nad pochodzeniem mięsa i innych produktów konsumpcyjnych

pochodzenia zwierzęcego, dotychczasowe próby zastosowania technik molekularnych, opierano głównie na analizie PCR-RFLP. Ukierunkowanie tych analiz na rozpoznawanie materiału pochodzącego tylko od wybranych (tradycyjnych) gatunków zwierząt gospodarskich sprawia, że żadnej nie można zastosować do różnicowej diagnostyki śladów ludzkich i zwierzęcych.

W dotychczasowych badaniach własnych weryfikowano przydatność analizy sekwencji genu cytochromu b (*cytb*) do określania pochodzenia śladów biologicznych zwierząt i ludzi. Przy wyborze do badań identyfikacyjnych tego modelu kierowano się następującymi przesłankami. Procedura identyfikacji gatunkowego pochodzenia anonimowego śladu powinna przede wszystkim gwarantować możliwość rozróżnienia między dużą liczbą gatunków, od których mogą pochodzić anonimowe ślady biologiczne. Wybrany do analizy region genomu powinien zatem charakteryzować się kumulowaniem mutacji w takim tempie, aby nawet gatunki ze sobą spokrewnione posiadały unikalną sekwencję nukleotydową. Nie może to być jednak region kumulujący mutacje wyjątkowo szybko, aby wygenerowana w ten sposób duża zmienność w obrębie gatunku nie zaciemniała lub wręcz uniemożliwiała dokonanie wiarygodnego rozróżnienia między gatunkami. Ponadto region mtDNA obrany do analizy powinien być na tyle duży, aby istniało maksymalne prawdopodobieństwo wystąpienia różnic w sekwencji umożliwiających uchwycenie zmienności między gatunkami. W badaniach własnych wykazano, że poziom zmienności międzygatunkowej w genie cytochromu b pozwala na rozróżnienie próbek pochodzących nawet od blisko spokrewnionych gatunków. Należałoby także stwierdzić czy w genetycznych bazach danych znajduje się dostatecznie dużo informacji o polimorfizmie danego regionu DNA, które można by wykorzystać w badaniach własnych, bez konieczności przeprowadzania odrębnych analiz. Ten ostatni element ma duże praktyczne znaczenie, ponieważ identyfikacja anonimowych śladów wiąże się z koniecznością porównywania uzyskanej sekwencji z wieloma sekwencjami o znanym pochodzeniu, w celu znalezienia najbardziej zbliżonego odpowiednika.

Gen cytochromu b ma wielkość 1141 par zasad i koduje białko złożone z 380 aminokwasów, będące elementem III kompleksu oksydacyjnofosforylacyjnego (kompleks  $bc_1$ ). Kompleks  $bc_1$  składa się z 11 polipeptydowych podjednostek, a cytochrom b jest jedynym polipeptydem kompleksu, kodowanym przez mtDNA. Charakteryzuje się wysoką konserwatywnością, co wynika z faktu, że proces oddychania komórkowego jest kluczowym procesem warunkującym funkcjonowanie organizmu, zatem mutacje znacznie upośledzające biologiczną funkcję tego białka są zwykle letalne. Gen *cytb* jest zatem elementem jednego z najstarszych ewolucyjnie atrybutów życia, jakim jest tzw. oddychanie metaboliczne. Można przypuszczać, że niezależnie od trwałych zmian w sekwencji genu *cytb*, kumulowanych na skutek braku niektórych mechanizmów naprawczych podczas replikacji mtDNA, mogą być także obecne zmiany będące odzwierciedleniem kształtowania metabolicznego procesu oddychania, towarzyszące wyodrębnianiu się gatunków w różnym środowisku i pod wpływem presji selekcji naturalnej, oddziałującej w czasie zasiedlania nowych nisz ekologicznych. Na tej podstawie można zakładać, że u poszczególnych gatunków występować może charakterystyczny obraz sekwencji *cytb*

mtDNA, co można by wykorzystać jako element odtwarzania filogenetycznego drzewa gatunków.

Kierując się powyższymi przesłankami, przydatność porównawczej analizy polimorfizmu sekwencji genu *cytb* w nadzorze weterynaryjnym oraz w badaniach sądowych określono na podstawie:

- stopnia niezawodności odróżnienia śladu ludzkiego od śladu zwierzęcego,
- siły dyskryminacji przy rozróżnianiu śladów pochodzących od gatunków ewolucyjnie pokrewnych (bydło domowe, żubr, bizon).

Próbkami referencyjnymi pochodzącymi od ludzi były włosy pobrane od dwóch dorosłych osób. Natomiast materiał zwierzęcy stanowiły próbki sierści bizonów, żubrów, próbki sierści bydła zebu z Indii, próbki krwi od krów rasy polskiej czerwonej i białogrzbiętej z hodowli zachowawczej, a także różnego rodzaju tkanki stanowiące materiał archiwalny. Mitochondrialny DNA ekstrahowano z próbek według procedury organicznej, modyfikując metodykę w zależności od rodzaju analizowanego śladu.

Amplifikowano i sekwencjonowano fragment genu *cytb* o wielkości ok. 300 par zasad (14897-15170, wg numeracji referencyjnej sekwencji ludzkiego mtDNA). Kodowana przez ten region sekwencja aminokwasów zlokalizowana jest w początkowej części cząsteczki cytochromu b (między 52 a 143 aminokwasem). Region ten uważa się za najbardziej informatywny w zakresie obecności podstawień nukleotydowych, umożliwiających różnicowanie gatunków oraz określanie genetycznych i ewolucyjnych relacji między taksonami.

#### Tabela

**Porównanie sekwencji nukleotydowej fragmentu genu *cytb* mtDNA u badanych gatunków (%)**

Gatunek	Żubr	Bizon	Bydło domowe (rasa polska czerwona)	Bydło domowe (rasa białogrzbieta)	Bydło domowe (zebu)	Człowiek
Żubr	–	91	92	92	92	75
Bizon	91	–	94	94	94	76
Bydło domowe (rasa polska czerwona)	92	94	–	100	100	77
Bydło domowe (rasa białogrzbieta)	92	94	100	–	100	77
Bydło domowe (zebu)	92	94	100	100	–	77
Człowiek	75	76	77	77	77	–

Gatunkową specyfikę zidentyfikowanych sekwencji weryfikowano poprzez przeszukiwanie bazy danych GenBank i porównywano w zakresie wszystkich par zasad, wykorzystując opcję *standard nucleotide-nucleotide* programu BLAST.

Uzyskano jednoznaczny odczyt wszystkich pozycji w sekwencji DNA. Wiarygodność wyników sekwencjonowania zweryfikowano poprzez porównanie sekwencji „własnych” z opublikowanymi przez innych autorów w światowej bazie danych GenBank. Dla wszystkich gatunków znaleziono sek-

wencje identyczne lub o podobieństwie przekraczającym 99%. Fakt ten dowodzi, że wyniki sekwencjonowania DNA, uzyskiwane według stosowanej procedury, są w pełni wiarygodne i mogą być wykorzystane do międzynarodowej wymiany informacji o polimorfizmie genu *cytb* mtDNA u ludzi z różnych grup etnicznych oraz u gatunków światowej fauny.

Niezawodność zidentyfikowania śladu biologicznego zależy od siły dyskryminacji analizowanego układu genetycznego, zatem głównym kryterium wyboru genu (lub jego fragmentu) do analizy jest możliwość rozróżnienia między dużą liczbą gatunków nawet blisko spokrewnionych. W przypadku sekwencji genu *cytb* mtDNA, siłę dyskryminacji można ogólnie zdefiniować jako prawdopodobieństwo, że dwa losowo wybrane gatunki nie będą miały identycznej sekwencji. W badaniach dowodów rzeczowych w sprawach sądowych najistotniejsze jest niezawodne odróżnienie śladu ludzkiego od śladu zwierzęcego, co jest podstawowym warunkiem dla właściwego ukierunkowania postępowania. Natomiast z punktu widzenia oceny skuteczności procedury identyfikacyjnej i możliwości jej wykorzystywania w nadzorze nad produktami pochodzenia zwierzęcego, siłę dyskryminacji zdefiniować można jako prawdopodobieństwo rozróżnienia między gatunkami pokrewnymi. Podobieństwo między sekwencjami, oszacowane na podstawie liczby pozycji zmiennych, waha się w granicach od 73% (człowiek ↔ żubr) do 76% (człowiek ↔ bizon). Natomiast w przypadkach wzajemnych porównań między gatunkami płemienia *bovini* (gatunki blisko spokrewnione) podobieństwo dochodzi prawie do 95%. Warto podkreślić, że poziom zmienności wewnątrzgatunkowej zawiera się w przedziale od 0,25% do 2,74%, a poziom zmienności międzygatunkowej – w przedziale od 5,47% do 34,83%.

Pojedyncze różnice w sekwencji nukleotydowej w genie cytochromu b, u osobników należących do tego samego gatunku, występują zwłaszcza u gatunków o dużym zasięgu geograficznym. Po przemianowaniu sekwencji nukleotydowych na sekwencje aminokwasów w białku cytochromu b, podobieństwo jest jeszcze wyższe, a między niektórymi gatunkami płemienia *bovini* – całkowite (zasada supertolerancji w mitochondrialnym kodzie genetycznym).

W tabeli przedstawiono liczbę podstawień nukleotydowych różniących sekwencje analizowanych gatunków. Sekwencja człowieka różni się od pozostałych gatunków około 70 podstawieniami, co dowodzi iż prawdopodobieństwo trafnego rozróżnienia tych śladów jest tożsame z pewnością. Wprawdzie w obrębie pokrewnych gatunków płemienia *bovini*, liczba różnic w składzie nukleotydowym sekwencji jest niższa (tab.), lecz na tyle wysoka, że umożliwia wiarygodne rozróżnienie pochodzenia śladów. Na przykład wystąpienie aż 22 różnic w analizowa-

nym fragmencie genu *cytb* u żubrów i bizonów dowodzi, że siła dyskryminacji przy rozpoznawaniu próbek, pochodzących od osobników nawet z pokrewnych grup taksonomicznych, jest olbrzymia, a prawdopodobieństwo spotkania dwóch gatunków o identycznej sekwencji jest praktycznie niemożliwe. Stwarza to możliwość szerokiego wykorzystania analizy sekwencji genu *cytb* mtDNA do różnicowej identyfikacji anonimowych próbek (śladów) biologicznych, pochodzących od wielu gatunków.