

Witold Pepiński, Małgorzata Skawrońska, Anna Niemcunowicz-Janica,
Ewa Koc-Zórawska, Jerzy Janica

Polimorfizm czterech loci STR na chromosomie X w populacji Podlasia

Polymorphism of four X-chromosomal STRs in a population sample of Podlasie (NE Poland)

Z Zakładu Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. Jerzy Janica

Celem pracy było określenie częstości alleli czterech loci STR zlokalizowanych na chromosomie X człowieka oraz obliczenie parametrów ich przydatności w badaniach medyczno-sądowych. Badania populacyjne przeprowadzono na 300 próbkach krwi obwodowej pobranych od niespokrewnionych osób obojga płci wywodzących się z regionu Podlasia. Obserwowany rozkład częstości genotypów analizowanych loci w próbce populacyjnej kobiet znajduje się w równowadze Hardy-Weinberga. Obliczone parametry biostatystyczne wskazują na dużą przydatność analizowanego zestawu w przypadkach, gdy markery autosomalne nie dostarczają jednoznacznych wyników dla ustalenia pokrewieństwa.

Allele frequencies for four X-chromosomal STR were determined in a population sample of 240 unrelated males and females from north-eastern Poland by multiplex PCR and subsequent automated fluorescent detection (ABI 310) using a commercially available multiplex PCR kit (Mentype Argus X-UL). The genotype distributions among the females conformed with HWE for all analysed loci. The analysed quadruplex is a potential extension to a battery of autosomal systems in forensic applications, especially in the investigation of kinship analysis and deficiency cases.

Słowa kluczowe: STR, chromosom X, genetyka populacyjna, Podlasie
Key words: STRs, chromosome X, population genetics, Northeastern Poland

WSTĘP

Analiza polimorficznych loci specyficznych dla chromosomu X jest zasadna tylko wówczas, gdy płeć fenotypowa jest identyczna z płcią genetyczną wszystkich badanych osób. Celem pracy było zbadanie częstości alleli czterech loci zlokalizowanych na chromosomie X człowieka: DX8378, DX7132, HPRTB i DX7423, oraz analiza parametrów ich przydatności w badaniach medyczno-sądowych.

MATERIAŁ I METODY

Wymazy nabłonka jamy ustnej pobrano od 300 osób polskiego pochodzenia zamieszkujących obszar Podlasia (150 kobiet i 150 mężczyzn). W celu określenia częstości mutacji wykonano badanie tripletów w 100 sprawach o dochodzenie ojcostwa z potomstwem 56 chłopców i 44 dziewczynki, w których ojcostwo potwierdzono na podstawie badania loci autosomalnych przy poziomie prawdopodobieństwa powyżej 99,999 %. DNA izolowano przy użyciu metody z cheleksem 100 i proteinazą K [11]. Ilość DNA oceniano metodą spektrofotometryczną. Matryce DNA w ilości 0,5-1 ng amplifikowano zgodnie z instrukcją producenta (Biotype AG, Germany) w termocyklerze PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) stosując zestaw Mentype Argus X-UL pozwalający na koamplifikację i detekcję czterech loci: DX8378, DX7132, HPRTB i DX7423. Elektroforezę i oznaczanie

nie alleli przeprowadzono przy użyciu analizatora ABI 310 (Applied Biosystems, USA) stosując polimer POP-4 i referencyjne drabiny alleli zawarte w zestawie. Program Genotyper v2.5 użyto w połączeniu z makrem udostępnionym w pliku Mentype Argus X-UL Template File. Jako standard wewnętrzny wykorzystano DNA Size Standard 400HD znakowany fluorochromem ROX. Częstości alleli każdego locus obliczono oddzielnie dla kobiet i dla mężczyzn (odpowiednio 300 i 150 chromosomów). Porównanie częstości alleli u kobiet i mężczyzn przeprowadzono posługując się tabelą kontyngencji RxC [8]. Zgodność z rozkładem Hardy-Weinberga (HWE) sprawdzano stosując test dokładny [4] zawarty w oprogramowaniu GDA v1.2 [6]. Dodatkowo obliczono następujące parametry biostatystyczne: obserwowaną i oczekiwaną heterozygotyczność (H_o , H_e) [7], współczynnik informacji o polimorfizmie (PIC) [1], teoretyczną szansę wykluczenia (MEC) [5], oczekiwane prawdopodobieństwo wykluczenia (PE) oraz siłę dyskryminacji u mężczyzn (DP_M) i u kobiet

(DP_F) [2]. Porównanie rozkładów częstości alleli między populacjami przeprowadzono przy użyciu testu kontyngencji (RxC contingency test; G. Carmody, Ottawa, Canada).

WYNIKI

Częstości alleli i parametry biostatystyczne obliczone dla czterech loci STR chromosomu X w populacji Podlasia przedstawiono w tabeli 1. We wszystkich analizowanych loci rozkłady częstości genotypów wśród kobiet były zgodne z rozkładami częstości genotypów wyznaczonymi w oparciu o regułę Hardy-Weinberga ($0,05 < P$). Nie stwierdzono różnic w rozkładach alleli między grupą kobiet i grupą mężczyzn ($0,4230 < P < 0,9940$), dlatego częstości w obu grupach dla poszczególnych loci zostały połączone. Nie wykryto mutacji w żadnym z analizowanych loci na podstawie 56 transferów matka-syn i 44 transferów ojciec-córka.

Tabela 1. Częstości alleli i parametry biostatystyczne dla czterech loci STR na chromosomie X w próbie populacyjnej Podlasia.

Table 1. Allele distribution and biostatistical parameters for 4 X-chromosomal STR markers in a population sample of Northeastern Poland.

	DX8378			HPRTB			DX7423			DX7132		
Allele	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T
8		0,0042	0,0028									
9	0,0083	0,0125	0,0111	0,0167	0,0250	0,0222						
10	0,2500	0,3708	0,3306	–	–	–						
11	0,3667	0,3042	0,3250	0,0833	0,1250	0,1111				0,0250	0,0042	0,0111
12	0,3250	0,2792	0,2944	0,3500	0,3708	0,3639				0,0917	0,0625	0,0722
13	0,0500	0,0250	0,0333	0,3500	0,2833	0,3056	0,1250	0,1417	0,1361	0,3417	0,3250	0,3306
14		–	–	0,1500	0,1375	0,1417	0,3333	0,2750	0,2944	0,3583	0,3708	0,3667
15		0,0042	0,0028	0,0417	0,0458	0,0444	0,4083	0,3958	0,4000	0,1750	0,1958	0,1889
16				0,0083	0,0083	0,0083	0,1250	0,1583	0,1472	0,0083	0,0333	0,0250
17					0,0042	0,0028	0,0083	0,0292	0,0222		0,0083	0,0056
P	0,4141			0,1478			0,5803			0,9766		
H_o	0,640			0,783			0,758			0,717		
H_e	0,694			0,748			0,725			0,716		
PIC	0,63			0,71			0,68			0,66		
MEC	0,636			0,698			0,664			0,664		
PE	0,490			0,560			0,520			0,522		
DP_M	0,695			0,724			0,691			0,715		
DP_F	0,843			0,896			0,874			0,867		

M: mężczyźni, F: kobiety, T: łącznie, P : prawdopodobieństwo testu dokładnego, H_o : heterozygotyczność obserwowana, H_e : heterozygotyczność oczekiwana, PIC: wskaźnik informacji o polimorfizmie, MEC: teoretyczna szansa wykluczenia, PE: oczekiwane prawdopodobieństwo wykluczenia (w parach ojciec/córka), DP_M : siła dyskryminacji u mężczyzn, DP_F : siła dyskryminacji u kobiet

DYSKUSJA

Wszystkie analizowane markery posiadają allele różniące się o cztery tandemowe powtórzenia nukleotydowe i zlokalizowane są odpowiednio w 1, 2, 3 i 4 grupie sprzężeniowej na chromosomie X [10]. Wyniki testu dokładnego użytego w celu analizy naruszenia równowagi sprzężeń nie wykazały zależności między allelami poszczególnych loci ($0,1536 < P < 0,8541$), stąd zostały one potraktowane jako niezależne od siebie, podobnie do systemów autosomalnych. Oceniany kwadrupleks charakteryzuje się łączną teoretyczną szansą wykluczenia równą 0,8043 i łączną siłą dyskryminacji równą 0,9926 dla mężczyzn i 0,9997 dla kobiet. Porównanie częstości alleli uzyskanych dla badanej populacji polskiej z częstościami opisanymi w populacji niemieckiej [3, 9], przy pomocy testu Carmody'ego, nie wykazało istotnych statystycznie różnic ($0,5610 < P < 0,9740$ i $0,5640 < P < 0,9740$; odpowiednio test χ^2 i G-statistic). W przypadku locus DX8378 w próbie polskiej pojawił się allel 15, który nie został stwierdzony w populacji niemieckiej, natomiast allel 10 obserwowany u Niemców w locus HPRTB nie wystąpił w populacji polskiej.

WNIOSKI

1. Zgodność z prawem Hardy-Weinberga pozwala na stosowanie wszystkich analizowanych loci w badaniach pokrewieństwa oraz identyfikacji.
2. Obliczone parametry statystyczne wskazują na dużą przydatność kwadrupleksu Mentype Argus X-UL w przypadkach, gdy markery autosomalne nie dostarczają jednoznacznych wyników dla ustalenia pokrewieństwa.

PIŚMIENNICTWO

1. Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davies R. W.: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Genet*, 1980; 32: 314-331.
2. Desmarais D., Zhong Y., Chakraborty R., Perreault C., Busque L.: Development of a highly poly-

morphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA). *J. Forensic Sci*, 1998; 43: 1046-1049.

3. Edelmann J., Hering S., Michael M., Lessig R., Deischel D., Meier-Sundhausen G., Roewer L., Platte I., Szibor R.: 16 X-chromosome STR loci frequency data from a German population. *Forensic Sci Int*, 2001; 124: 215-218.

4. Guo S. W., Thompson E. A.: Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 1992; 48: 361-372.

5. Kishida T., Tamaki Y.: Japanese population data on X-chromosomal STR locus AR. *Nippon Hoigaku Zasshi*, 1997; 51: 376-379.

6. Lewis P. O., Zaykin D.: Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.

7. Nei M., Roychoudhury A. K.: Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 1974; 76: 379-390.

8. Roff D. A., Bentzen P.: The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: χ^2 and the problem of small samples. *Mol. Biol. Evol*, 1989; 6: 539-545.

9. Szibor R., Edelmann J., Zarrabeitia M. T., Riancho J. A.: Sequence structure and population data of the X-linked markers DXS7423 and DXS8377 – clarification of conflicting statements published by two working groups. *Forensic Sci Int*, 2003; 134: 72-73.

10. Szibor R., Krawczak M., Hering S., Edelmann J., Kuhlisch E., Krause D.: Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int J Legal Med*, 2003; 117: 67-74.

11. Wiegand P., Bajanowski T., Brinkmann B.: PCR typing of debris from fingernails. *Int J Legal Med*, 1993; 106: 81-84.

Adres pierwszego autora:
Zakład Medycyny Sądowej AMB
ul. Waszyngtona 13
15-269 Białystok
E-mail: pepinski@amb.edu.pl (W. Pepinski)