

Magdalena Konarzewska^a, Magdalena Spólnicka^a, Ireneusz Sołtyszewski^a, Jarosław Berent^b

Polimorfizm locus HUMHUU w populacji polskiej – doniesienie wstępne

Polymorphism of the locus HUMHUU in Polish population – a preliminary report

Z Wydziału Biologii Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Komendy Głównej Policji^a

Naczelnik: dr n. med. Ireneusz Sołtyszewski i z zakładu Orzecznictwa Sądowo-Lekarskiego i Ubezpieczeniowego Katedry Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi^b

Kierownik: dr hab. n. med. Jarosław Berent, prof. nadzw. UM

Praca przedstawia wyniki badań populacyjnych zlokalizowanego na chromosomie 16 locus HUMHUU, będącego niekodującym fragmentem ludzkiego DNA zbudowanego z czteronukleotydu powtórzeń (CTTT)_n. Badania przeprowadzone na grupie 200 niespokrewnionych osób wykazały obecność 14 różnych alleli o długości od 150 do 200 pz. Obliczenia biostatystyczne wykazały, że heterozygotyczność oczekiwana wynosi 0,830301 +/- 0,018768, PD 0,949156, PIC 0,806888, PE 0,662444, PE dla dwójek bez matki 0,491305 a średnia szansa ojcostwa 2,946389. Wyniki uzyskane w trakcie analizy statystycznej locus HUMHUU pozwalają zakwalifikować go jako marker użyteczny w identyfikacji osobniczej dla potrzeb kryminalistyki, jak również w badaniach spornego ojcostwa.

The paper presents results of the population research on the locus HUMHUU, which is a non-coding fragment of human DNA built of four nucleotide repeats (CTTT)_n, localized on the 16th chromosome. The studies, carried out on a group of 200 non-related persons, showed the presence of 14 different alleles, from 150 to 200 bp in length. Biostatistical calculations showed that expected heterozygosity was 0,830301 +/- 0,018768, PD 0,949156, PIC 0,806888, PE 0,662444, PE for motherless cases 0,491305, and the average paternity index 2,946389. The results received during the studies of the locus HUMHUU allow for recognizing it as a marker of personal identification useful for the needs of both criminalistics and disputed paternity testing.

Słowa kluczowe: STR, HUMHUU, dane populacyjne

Key words: STR, HUMHUU, population data

WSTĘP

Sekwencje typu STR są markerami powszechnie stosowanymi w badaniach z zakresu genetyki sądowej, gdyż ich badanie jest skutecznym i szybkim sposobem identyfikacji próbek ludzkiego materiału biologicznego [1]. Podstawową metodą badawczą jest jednoczesna amplifikacja wielu loci STR z różnych miejsc ludzkiego DNA tzw. systemów multipleksowych. Analizowany profil powinien wykazać jak najwyższą siłę dyskryminacji, co jest uzależnione między innymi od ilości loci składających się na analizowany profil oraz od polimorfizmu pojedynczego locus. Z tego powodu ciągle poszukuje się nowych loci, spełniających szereg kryteriów pozwalających zakwalifikować je do kryminalistycznej identyfikacji osób. Warunkiem wprowadzenia nowego locus do praktyki genetyki sądowej jest nie tylko sprawdzenie stosowanej dla niego metody w zakresie jej czułości, wiarygodności i powtarzalności, ale również opracowania uzyskanych wyników badań w zakresie częstości występowania poszczególnych alleli tego locus w danej populacji.

Locus HUMHUU zlokalizowane na chromosomie 16, zbudowane z czteronukleotydu powtórzeń

(CTTT)_n jest nowym locus typu STR, mogącym znaleźć zastosowanie zarówno w identyfikacji osobniczej, jak i dochodzeniu spornego ojcostwa. Sekwencję primerów dla tego locus opracował w 1998 roku zespół kierowany przez prof. Andrzeja Płucienniczaka z Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie, który jednak nie opublikował dalej wyników swych prac poza zgłoszeniem patentowym. Na wykorzystanie sekwencji primerów do obecnych badań uzyskaliśmy zgodę prof. Andrzeja Płucienniczaka. Primery te według niego posiadają następującą sekwencję: 5'-GAGCCAAGATCACACCCACA – 3' i 5'-GAACTGGGACGGGAAATTCA – 3' a polimorficzny fragment znajduje się w miejscu oznaczonym w Banku Genów HUU95743 130306-130508 [2].

CEL PRACY

Celem pracy było utworzenie systemu fluorescencyjnej analizy locus HUMHUU dla automatycznego sekwenatora ABI PRISM 3100 firmy Applied Biosystems, sprawdzenie jego wiarygodności i opracowanie biostatystycznych parametrów dla tego locus.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były wymazy z jamy ustnej pochodzące od 200 niespokrewnionych osób różnej płci i wieku z różnych regionów Polski. Izolację DNA genomowego przeprowadzono przy użyciu zestawu firmy QIAGEN™. Ilość DNA oznaczono za pomocą barwnika Picogreen w aparacie Ascent Fluorocan. Następnie przeprowadzono optymalizację reakcji amplifikacji PCR, tj. dobrano stężenia starterów, ilość matrycy DNA, Taq polimerazy, ustalono warunki temperaturowe oraz ilość cykli. Reakcję PCR prowadzono w aparacie GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems w objętości 25 mikrolitrów. Optymalne warunki amplifikacji ustalono jako: 1x PCR Bufor (Promega Co.), 1,5 mikrolitra MgCl₂ 25 mM, 0,2 mikrolitra dNTPs 0,25 mM (Promega Co.), primer F/R 2,5 pmol, 1 U Taq DNA Polymerase (Promega Co.) i 3 ng genomowego DNA. Optymalny profil temperaturowy reakcji: denaturacja wstępna – 94 stopnie C 2 minuty, następnie 32 cykle – 94 stopnie C 30 sekund, 66 stopni C 30 sekund, 72 stopnie C 30 sekund i końcowe wydłużanie 72 stopnie C 7 minut. Do amplifikacji wykorzystano startery o sekwencji:

F: 5'-FAM – GAGCCAAGATCACACCCACA – 3'
R: 5'-GAACTGGGACGGGAAATTCA – 3'

Produkty reakcji PCR poddano elektroforezie kapilarnej, w aparacie ABI PRISM 3100 Applied Biosystems. Produkty rozdzielano w kapilarze 3100 – 36 cm wypełnionej denaturującym nośnikiem POP4. Analizę otrzymanych wyników przeprowadzono przy użyciu oprogramowania GeneScan 3.7. NT wobec standardu wewnętrznego wielkości ILS 600 (Promega Co.).

Statystyczne opracowanie wyników przeprowadzono przy użyciu programów komputerowych GDA [3] i DLP [4], pracujących na danych w standardzie NEXUS [5]. Obliczono heterozygotyczność obserwowaną i oczekiwaną oraz jej błąd [6], siłę dyskryminacji [7], współczynnik informacji o polimorfizmie [8], siłę wykluczenia dla pełnych [9] i niepełnych trójek [10], jak również minimalną i maksymalną [11] oraz średnią szansę ojcostwa [12].

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Analiza próbek DNA pochodzących od 200 niespokrewnionych osób z populacji polskiej wykazała obecność 14 alleli locus HUMHUU. Rozkład częstości alleli był zgodny rozkładem wynikającym z prawa Hardy'ego-Weinberga ($p=0,668125$). Wielkości zaobserwowanych alleli oraz ich częstości występowania w badanej populacji przedstawia tabela I, zaś statystyczne parametry oceniające przydatność tego locus dla genetycznych ekspertyz sądowych przedstawiono w tabeli II.

Tabela I. Rozkład częstości alleli HUMHUU w populacji polskiej.

Table I. Distribution of HUMHUU allele frequencies in the Polish population.

Allel	Ilość	Częstość
200	1	0,0025
196	8	0,0200
192	7	0,0175
188	24	0,0600
184	59	0,1475
182	1	0,0025
180	108	0,2700
176	79	0,1975
172	68	0,1700
168	21	0,0525
164	18	0,0450
160	1	0,0025
158	4	0,0100
150	1	0,0025
Razem	400	1,0000

Tabela II. Parametry biostatystyczne określające stopień polimorfizmu locus HUMHUU.

Table II. Biostatistical parameters determining the degree of HUMHUU locus polymorphism.

HUMHUU	
Ilość osób w populacji	200
Ilość rodzajów alleli	14
Heterozygotyczność obserwowana	0,850000
Heterozygotyczność oczekiwana	0,830301
Błąd heterozygotyczności oczekiwanej	0,018768
Siła dyskryminacji (PD)	0,949156
Współczynnik informacji o polimorfizmie (PIC)	0,806888
Siła wykluczenia dla pełnych trójek (PE)	0,662444
Siła wykluczenia dla dwójek bez matki	0,491305
Minimalna szansa ojcostwa	1,069519
Średnia szansa ojcostwa (TPI)	2,946389
Maksymalna szansa ojcostwa	400,000000

Uzyskane wyniki obliczeń biostatystycznych porównano z wynikami analizy próbki populacji polskiej otrzymanymi dla 9 loci typu STR (D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S17, D7S820) z zestawu Profiler Plus przedstawionymi przez Pawłowskiego i wsp. [13]. Locus HUMHUU charakteryzuje się dość dużą liczbą alleli, jedynie w locus FGA, D21S11 i D18S51 zaobserwowano większą liczbę alleli. Analizowane locus wykazuje wysoką siłę dyskryminacji (PD) porównywalną z locus D21S11, jak również wysoki wskaźnik PIC porównywalny z locus D21S11, jak i locus FGA. Heterozygotyczność obserwowana w populacji polskiej przewyższa wartości heterozygotyczności wszystkich loci z zestawu Profiler Plus. Wartość PE locus HUMHUU znacznie przewyższa wartość PE locus D21S11 w próbce populacyjnej Polski północno-wschodniej [14].

Dalsze badania locus HUMHUU będą obejmowały analizę sekwencyjną alleli dla sprawdzenia czy w układzie tym oprócz polimorfizmu długości występuje również polimorfizm sekwencji, na co może wskazywać np. stwierdzenie w niniejszych badaniach allela o niekompletnej liczbie powtórzeń (182 pz).

WNIOSKI

Wyniki uzyskane w trakcie analizy statystycznej locus HUMHUU pozwalają zakwalifikować go jako marker użyteczny w identyfikacji osobniczej dla potrzeb kryminalistyki, jak również w badaniach spornego ojcostwa. Biorąc pod uwagę, że badania zostały przeprowadzone jedynie na liczbie 200 osób, należałoby zbadać większą liczbę osób z te-

renu całej Polski, aby potwierdzić uzyskane wyniki i stworzyć drabinę alleli oraz system analizy do wykorzystania w rutynowych badaniach kryminalistycznych. Przedmiotem dalszych badań będzie również stworzenie multipleksowego zestawu zawierającego locus HUMHUU.

PIŚMIENNICTWO

1. Brinkmann B.: The STR approach. *Adv. Forensic Haemogenetics* 1996, 6, 41-51.
2. Płucienniczak A., Płucienniczak G., Mikiewicz D., Jagiełło A., Dąbrowska H., Wojtuszek E. i Chmiel A.: Genetyczny marker, oligonukleotydowe startery, sposób oraz zestaw do analizy materiału genetycznego. Zgłoszenia patentowe nr 328190. *Biuletyn Urzędu Patentowego RP* nr 5/2000.
3. Lewis P. O. i Zaykin D.: *Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c)*, 2001, <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.
4. Berent J. i Szram S.: DLP – a computer program for calculation of discrete locus parameters. *Forensic Sci.* 2003, 1, 46-47.
5. Maddison D. R., Swofford D. L. i Maddison W. P.: NEXUS: an extensive file format for systematic information. *Syst. Biol.* 1997, 46, 590-621.
6. Nei M. i Roychoudhury A. K.: Sampling variants of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 1974, 76, 379-390.
7. National Research Council Report II. *The Evaluation of Forensic DNA Evidence*. National Academy Press, Washington, D.C. 1996, pp.96-97.
8. Botstein D., White R. L., Skolnick M. i Davis R. W.: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 1980, 32, 314-331.
9. Weir B. S.: *Genetic Data Analysis II*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts 1996, pp. 209-211.
10. Fung W. K., Chung Y. K. i Wong D. M.: Power of exclusion revisited: probability of excluding relatives of the true father from paternity. *Int. J. Legal Med.* 2002, 116, 64-67.
11. Berent J. A., Miścicka-Śliwka D. i Czarny J.: Średnie wartości szansy ojcostwa – obliczenia dla populacji polskiej. *Arch. Med. Sąd. i Kryminol.* 1999, 49, 11-15.
12. Brenner C., Morris J. W.: Paternity index calculations in single locus hypervariable DNA probes: validation and other studies. *Proceedings from the*

International Symposium on Human Identification 1989, Promega, Madison 1990, pp. 21-53.

13. Pawłowski R., Dettlaff-Kąkol A., Jezierski G., Maciejewska A., Paszkowska R., Reichert M.: Genetyka populacyjna dziewięciu loci typu STR z zestawu Profiler Plus w próbce populacyjnej z obszaru Polski. Arch. Med. Sąd. Kryminol. 2000, 50, 207-213.

14. Pepiński W., Skawrońska M., Janica J., Niemcunowicz-Janica A., Sołtyszewski I., Wardaszka Z.: Genetyka populacyjna 10 loci typu STR w próbce

populacyjnej Podlasia (Polska północno-wschodnia). Arch. Med. Sąd. Kryminol. 2003, 53(1), 49-56.

Adres do korespondencji:

Dr hab. n. med. Jarosław Berent, prof. nadzw. UM
Zakład Orzecznictwa Sądowo-Lekarskiego
i Ubezpieczeniowego
Katedry Medycyny Sądowej Uniwersytetu
Medycznego w Łodzi
ul. Sędziowska 18a, 91-304 Łódź