

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

Polimorfizm czterech loci X-STR wśród ludności Polski północno-wschodniej w aspekcie przydatności w badaniach medyczo-sądowych

Forensic usefulness of four X-chromosomal STR polymorphisms in north-eastern Poland

Z Zakładu Medycyny Sądowej AM w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. J. Janica

Celem pracy było określenie częstości alleli czterech loci STR zlokalizowanych na chromosomie X człowieka oraz obliczenie parametrów ich przydatności w badaniach medyczo-sądowych. Badania populacyjne przeprowadzono na 1308 próbkach krwi obwodowej pobranych od niespokrewnionych osób obojga płci zamieszkujących teren Polski północno-wschodniej. W większości przypadków obserwowane rozkłady częstości genotypów analizowanych loci w próbkach populacyjnych kobiet znajdowały się w równowadze Hardy-Weinberga. Ujawniono istotne różnice statystyczne w rozkładach częstości cech X-STR między badanymi grupami. 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 1308 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 obtained data support the idea of genetic diversity among population groups of north-eastern Poland. The analysed quadruplex is a potential extension of the battery of autosomal systems in forensic applications, especially in the investigation of kinship analysis and deficiency cases.

Słowa kluczowe: STR, chromosom X, genetyka populacyjna, Polska północno-wschodnia
Key words: STRs, chromosome X, population genetics, north-eastern Poland

WSTĘP

Północno-wschodni region Polski charakteryzuje się największym w kraju zróżnicowaniem struktury narodowościowej i wysokim odsetkiem mniejszości narodowych i etnicznych. Celem pracy było określenie częstości alleli czterech loci STR zlokalizowanych na chromosomie X człowieka oraz obliczenie parametrów ich przydatności w badaniach medyczo-sądowych.

MATERIAŁ I METODY

Badania populacyjne przeprowadzono na 1308 próbkach krwi obwodowej pobranych od niespokrewnionych osób obojga płci, zamieszkujących teren Polski północno-wschodniej, należących do następujących grup: narodowości polskiej (120 ♂ /120 ♀), mniejszości narodowych białoruskiej (191 ♂ /103 ♀) i litewskiej (191 ♂ /103 ♀), mniejszości etnicznej Tatarów polskich (140 ♂ /70 ♀) oraz mniejszości wyznaniowej starowierców (140 ♂ /70 ♀). DNA izolowano przy użyciu metody z

cheleksem 100 i proteinazą K [1]. 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: DXS8378, DXS7132, HPRTB i DXS7423. Lokalizacja oraz zakres wielkości alleli poszczególnych loci przedstawia tabela I. Elektroforezę i genotypowanie 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

obliczano oddzielnie dla kobiet i dla mężczyzn. Porównanie częstości alleli u kobiet i mężczyzn przeprowadzono posługując się tabelą kontyngencji RxC [2]. Zgodność z rozkładem Hardy-Weinberga (HWE) oraz równowagę sprzężeń w poszczególnych parach loci sprawdzano stosując test dokładny Fishera [3] zawarty w oprogramowaniu GDA v1.2 [4]. Dodatkowo obliczono następujące parametry biostatystyczne: obserwowaną i oczekiwaną heterozygotyczność (H_o , H_e) [5], współczynnik informacji o polimorfizmie (PIC) [6], teoretyczną szansę wykluczenia (MEC) [7], oczekiwane prawdopodobieństwo wykluczenia (PE) oraz siłę dyskryminacji u mężczyzn (DP_M) i u kobiet (DP_F) [8]. Porównanie rozkładów częstości alleli między populacjami przeprowadzono przy użyciu testu kontyngencji test RxC (G. Carmody, Ottawa, Canada).

Tabela I. Lokalizacja chromosomowa loci zestawu Mentype Argus X-UL.

Table I. Chromosomal location of Mentype Argus X-UL loci.

Lokus Locus	Lokalizacja chromosomowa Chromosomal location	Wielkości alleli (pz) Allele length (bp)	Znacznik fluorescencyjny Fluorescent dye
AMY	Xp22,1-22,3	103,3	6-FAM
AMY	Yp11,2	109,3	6-FAM
DXS8378	Xp22,2	151-180	6-FAM
HPRTB	Xq26,2	183-224	6-FAM
DXS7423	Xq28	226-256	6-FAM
DXS7132	Xq11,2	279-308	6-FAM

WYNIKI I DYSKUSJA

Rozkłady częstości genotypów wśród kobiet w poszczególnych populacjach były zgodne z rozkładami wyznaczonymi w oparciu o regułę Hardy-Weinberga ($0,05 < P$) z wyjątkiem próbki populacyjnej starowierców w loci DXS7423 ($P=0,0001$) i HPRTB ($P=0,0440$). Nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych w rozkładach częstości alleli między grupami kobiet i mężczyzn ($0,1896 < P < 0,9940$), dlatego ich wartości dla poszczególnych loci zostały połączone. Częstości alleli i parametry biostatystyczne obliczone dla czterech loci STR chromosomu X w populacji Podlasia przedstawiono w tabeli II. Łączne wartości parametrów przydatności analizowanego kwadrupleksu w badaniach medyczno-sądowych przedstawiono w tabeli III. 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 [9]. Wyniki testu dokładnego

użytego w celu analizy naruszenia równowagi sprzężeń w badanych grupach nie wykazały zależności między poszczególnymi loci ($0,0836 < P < 0,9842$), z wyjątkiem pary DXS8378/DXS7132 ($P=0,0080$) w próbce populacyjnej mniejszości białoruskiej. Znamienne statystycznie różnice w rozkładach częstości alleli wykazano w locus HPRTB między mniejszością białoruską a mniejszością litewską ($P=0,0010$ i $P=0,0010$; odpowiednio Chi kwadrat i G-statistics), a także między Polakami a każdą z powyższych mniejszości ($P=0,0000$ i $P=0,0000$; $P=0,0160$ i $P=0,0010$). Ponadto, znamienne różnice wykazano między obydwoma mniejszościami w locus DXS7423 ($P=0,0000$ i $P=0,0000$). Rzadko reprezentowane (0,25-0,28%) w populacji polskiej allel 8 w DXS8378 i 17 w locus HPRTB były nieobecne w próbce białoruskiej, która z drugiej strony wykazywała allel 8 (0,5%) w HPRTB. Z drugiej strony, w próbce mniejszości litewskiej stwierdzono allel 12 (1,51%) w locus DXS7423, którego nie ujawniono u Polaków ani Białorusinów. Znamienne statystycz-

Tabela II. Częstości alleli i parametry biostatystyczne loci zestawu Mentype Argus X-UL w populacjach zamieszkujących teren Polski północno-wschodniej.

Table II. Allele distribution and biostatistical parameters for Mentype Argus X-UL loci in populations inhabiting north-eastern Poland.

Allele	DXS8378					HPRTB				
	PL	BY	LT	PT	OB	PL	BY	LT	PT	OB
8	0,0028	0,0000	0,0025	0,0000	0,0000	0,0000	0,0050	0,0000	0,0000	0,0000
9	0,0111	0,0101	0,0151	0,0195	0,0214	0,0222	0,0327	0,0126	0,0288	0,0464
10	0,3306	0,3401	0,3577	0,3242	0,2929	0,0000	0,0126	0,0302	0,0320	0,0036
11	0,3250	0,3526	0,3401	0,3168	0,3429	0,1111	0,1360	0,1285	0,0603	0,0893
12	0,2944	0,2594	0,2469	0,2707	0,2785	0,3639	0,2947	0,3199	0,2715	0,4464
13	0,0333	0,0378	0,0378	0,0607	0,0607	0,3056	0,2620	0,2695	0,4372	0,1857
14	0,0000	0,0000	0,0000	0,0082	0,0036	0,1417	0,2116	0,1436	0,1223	0,1321
15	0,0028	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0444	0,0252	0,0655	0,0391	0,0786
16						0,0083	0,0202	0,0277	0,0089	0,0179
17						0,0028	0,0000	0,0025	0,0000	0,0000
Ho	0,64	0,67	0,67	0,67	0,64	0,78	0,77	0,80	0,77	0,76
He	0,69	0,68	0,70	0,70	0,72	0,75	0,77	0,79	0,76	0,73
P	0,4141	0,7922	0,5303	0,2496	0,1344	0,1478	0,2378	0,1006	0,0866	0,0440
PIC	0,63	0,61	0,63	0,65	0,63	0,71	0,73	0,76	0,72	0,70
DP _M	0,695	0,704	0,693	0,703	0,715	0,724	0,786	0,766	0,722	0,735
DP _F	0,843	0,829	0,844	0,863	0,862	0,896	0,771	0,788	0,897	0,891
PE	0,490	0,483	0,488	0,504	0,517	0,560	0,614	0,621	0,578	0,563
MEC	0,636	0,629	0,634	0,657	0,661	0,698	0,745	0,751	0,700	0,702
Allele	DXS7423					DXS7132				
	PL	BY	LT	PT	OB	PL	BY	LT	PT	OB
11						0,0111	0,0050	0,0227	0,0036	0,0071
12	0,0000	0,0000	0,0151	0,0071	0,0036	0,0722	0,1008	0,0806	0,0929	0,1321
13	0,1361	0,1108	0,1209	0,1535	0,1536	0,3306	0,2972	0,2922	0,1322	0,2858
14	0,2944	0,3652	0,2418	0,2941	0,3071	0,3667	0,3879	0,4207	0,3947	0,3036
15	0,4000	0,4005	0,4635	0,2918	0,3036	0,1889	0,1763	0,1587	0,2715	0,1964
16	0,1472	0,1008	0,1360	0,2250	0,2000	0,0250	0,0277	0,0227	0,0553	0,0643
17	0,0222	0,0227	0,0227	0,0287	0,0321	0,0056	0,0050	0,0025	0,0501	0,0107
Ho	0,76	0,73	0,63	0,79	0,83	0,72	0,66	0,70	0,80	0,80
He	0,73	0,73	0,69	0,76	0,76	0,72	0,63	0,71	0,76	0,77
P	0,5803	0,2222	0,0863	0,1244	0,0001	0,9766	0,0734	0,1619	0,3668	0,6466
PIC	0,68	0,68	0,66	0,69	0,71	0,66	0,59	0,64	0,70	0,73
DP _M	0,691	0,705	0,685	0,721	0,745	0,715	0,706	0,722	0,761	0,764
DP _F	0,874	0,817	0,868	0,895	0,891	0,867	0,882	0,851	0,908	0,900
PE	0,520	0,482	0,504	0,553	0,566	0,522	0,529	0,514	0,578	0,593
MEC	0,664	0,627	0,649	0,699	0,705	0,664	0,672	0,657	0,704	0,728

PL: Polacy, BY: Białorusini, LT: Litwini, PT: Tatarzy polscy, OB: Starowiercy, P: prawdopodobieństwo testu dokładnego, Ho: heterozygotyczność obserwowana, He: heterozygotyczność oczekiwana, PIC: wskaźnik informacji o polimorfizmie, MEC: teoretyczna szansa wykluczania, PE: oczekiwane prawdopodobieństwo wykluczenia (w parach ojciec/córka), DP_M: siła dyskryminacji wśród mężczyzn, DP_F: siła dyskryminacji wśród kobiet
 PL: Poles, BY: Belorussians, LT: Lithuanians, PT: Polish Tatars, OB: Old Believers, P: exact test probability, Ho: observed heterozygosity, He: expected heterozygosity, PIC: polymorphic information content, MEC: mean exclusion chance, PE: probability of exclusion (father-daughter transfers), DP_M: discrimination power in males, DP_F: discrimination power in females

nie różnice wykazano w rozkładach częstości alleli loci HPRTB i DXS7132 między próbkami populacyjnymi starowierców i Tatarów polskich a populacją polską ($0,0000 < P < 0,0110$) oraz w rozkładach alleli locus HPRTB między starowiercami a Tatarami polskimi ($P=0,0000$). Rzadko reprezentowany w populacji polskiej allel 8 w locus DXS8378 i allel 17 w HPRTB (po 0,3%) nie zostały ujawnione w żadnej z tych mniejszości, u których natomiast stwierdzono allel 10 w HPRTB (odpowiednio, 0,4% i 3,2%) i allel 14 w DXS8378 (odpowiednio, 0,4% i 0,8%). Prezentowane wyniki potwierdzają poprzednie dane wykazujące na występowanie zróżnicowania genetycznego wśród grup etnicznych zamieszkujących północno-wschodnią część Polski [10].

Tabela III. Łączne wartości parametrów przydatności loci zestawu Mentype Argus X-UL w badaniach medyczo-sądowych dla populacji zamieszkujących teren Polski północno-wschodniej.

Table III. Combined values of forensic efficiency parameters for Mentype Argus X-UL loci in populations inhabiting north-eastern Poland.

	PL	BY	LT	PT	OB
DP _M	0,9926	0,9945	0,9937	0,9945	0,9957
DP _F	0,9997	0,9992	0,9993	0,9998	0,9999
MEC	0,8043	0,9884	0,9890	0,9808	0,9919

PL: Polacy, BY: Białorusini, LT: Litwini, PT: Tatarzy polscy, OB: Starowiercy, DP_M: siła dyskryminacji u mężczyzn, DP_F: siła dyskryminacji u kobiet, MEC: teoretyczna szansa wykluczenia

PL: Poles, BY: Belorussians, LT: Lithuanians, PT: Polish Tatars, OB: Old Believers, DP_M: discrimination power in males, DP_F: discrimination power in females, MEC: mean exclusion chance

WNIOSKI

1. Zgodność z prawem Hardy-Weinberga pozwala na stosowanie wszystkich analizowanych loci w badaniach pokrewieństwa oraz identyfikacji osobniczej.

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. Wiegand P., Bajanowski T., Brinkmann B.: PCR typing of debris from fingernails. *Int. J. Legal Med.*, 1993, 106, 81-84.
2. Roff D. A., Bentzen P.: The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: chi 2 and the problem of small samples. *Mol. Biol. Evol.*, 1989, 6, 539-545.
3. Guo S. W., Thompson E. A.: Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 1992, 48, 361-372.
4. 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>.
5. Nei M., Roychoudhury A. K.: Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*. 1974, 76, 379-390.
6. 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.
7. Kishida T., Tamaki Y.: Japanese population data on X-chromosomal STR locus AR. *Nippon Hoigaku Zasshi*. 1997, 51, 376-379.
8. Desmarais D., Zhong Y., Chakraborty R., Perreault C., Busque L.: Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA). *J. Forensic Sci.* 1998, 43, 1046-1049.
9. 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.
10. Pepiński W., Niemcunowicz-Janica A., Skawrońska M., Janica J. R., Koc-Żórawska E., Janica J., Sołtyszewski I.: Y-chromosome variation in northeastern Poland. *Progress In Forensic Genetics 11, International Congress Series*, 2006, 1288, 249-251.

Adres pierwszego autora:

Zakład Medycyny Sądowej AMB
15-269 Białystok

ul. Waszyngtona 13

e-mail: pepinski@amb.edu.pl (W. Pepinski)