

Witold Pepiński, Małgorzata Skawrońska, Anna Niemcunowicz-Janica, Jerzy Janica, Ireneusz Softyszewski

Polimorfizm 11 autosomalnych loci STR w populacji białoruskiej mniejszości narodowej zamieszkującej region Podlasia – rozszerzenie typowego panelu badawczego
Polymorphism of 11 autosomal STRs in a population sample of Belarussian minority residing in the region of Podlasie (Northeastern Poland) – an extension of the STR core set

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

Badania populacyjne przeprowadzono na 200 próbkach krwi obwodowej pobranych od niespokrewnionych osób obojga płci należących do białoruskiej mniejszości narodowej zamieszkującej region Podlasia. Celem pracy było określenie częstości alleli 11 autosomalnych loci STR człowieka oraz obliczenie parametrów ich przydatności w badaniach medycyno-sądowych. Obserwowane rozkłady częstości genotypów badanych loci znajdują się w równowadze Hardy-Weinberga. Analizowane systemy wykazują wysoką informatywność i mogą być przydatne w przypadkach wymagających rozszerzenia panelu badawczego opartego na systemie CODIS.

Population genetic data for 11 STRs included in the Humantype Chimera kit were obtained by multiplex PCR and subsequent automated fluorescent detection (ABI 310) from a sample of 200 unrelated individuals of both genders belonging to the Belarussian minority residing in the region of Podlasie (Northeastern Poland). The objective of the investigations was determination of 11 STRs frequency and calculation of parameters of their usefulness in medicolegal examinations. The genotype distributions conformed to HWE for all the analyzed loci. The highly polymorphic systems exhibit a high degree of informativeness and

are a potential extension to CODIS loci, particularly in kinship analysis and deficiency cases.

Słowa kluczowe: loci STR, genetyka populacyjna, białoruska mniejszość narodowa, Podlasie
Key words: STRs, population genetics, Belarussian minority, Podlasie (Northeastern Poland)

WSTĘP

Białoruska mniejszość narodowa w Polsce jest zjawiskiem autochtonicznym z niemal tysiącletnią historią. Z tej racji głównie, dysponuje własnym terytorium etnicznym. Podczas ostatniego narodowego spisu powszechnego w 2002 roku narodowość białoruską zadeklarowało 48 793 obywateli RP, w tym 46 041 w województwie podlaskim, zamieszkując głównie część środkową i wschodnią. Poza aspektem medycyno-sądowym, genotypowanie loci mikrosatelitarnych znalazło zastosowanie w celu rozróżniania komponenty komórkowej dawcy i biorcy w monitorowaniu przeszczepów szpiku kostnego. Jest to istotne dla oceny, czy przeszczep został

przyjęty lub powinna zostać podjęta terapia immunosupresyjna w celu zapobieżenia odrzutowi. Pełny i trwały chimeryzm potransplantacyjny, który występuje, gdy cały szpik dawcy przejmuje funkcję w organizmie biorcy, stanowi podstawę weryfikacji skuteczności allotransplantacji i pozwala na rokowanie odnośnie wznowy choroby. Zastosowanie multipleksowych zestawów markerów mikrosatelitarnych o odpowiedniej sile dyskryminacji oraz zautomatyzowanej techniki opartej na detekcji fluorescencyjnej pozwala na jakościową i ilościową ocenę stopnia chimeryzmu na podstawie parametrów wielkości pików alleli na elektroforegramie. Większość z loci multipleksu Humatype Chimera (Biotype, AG) nie była uwzględniana w istniejących bazach populacyjnych ani nie jest stosowana w praktyce medyczno-sądowej. Celem badania było określenie rozkładów częstości alleli 11 loci zestawu Humatype Chimera (z pominięciem locus D18S51 wchodzącego w skład systemu CODIS) oraz ocena ich przydatności w identyfikacji genetycznej. Oczekujemy, że badania polimorfizmu loci wchodzących w skład multipleksu Humatype Chimera przyczynią się do poznania tła populacyjnego rozkładu częstości oznaczonych cech genetycznych w populacji białoruskiej mniejszości narodowej oraz oceny ich przydatności w badaniach medyczno-sądowych, jak i monitorowaniu chimeryzmu komórkowego po przeszczepach szpiku kostnego.

MATERIAŁ I METODY

Wymazy nabłonka jamy ustnej pobrano od 200 osób należących do białoruskiej mniejszości narodowej zamieszkujących obszar Podlasia. DNA izolowano przy użyciu metody z cheleksem 100 i proteinazą K [1]. Pomiary stężenia matrycy DNA wykonano metodą spektrofotometryczną. Matryce DNA w ilości 0,5-1ng amplifikowano zgodnie z instrukcją producenta (Biotype AG, Germany) w termocyklerze PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) stosując zestaw Humatype Chimera obejmujący 12 loci: D2S1360, D3S1744, D4S2366, D5S2500, D6S474, D7S1517, D8S1132, D10S2325, D12S391, D18S51, D21S2055, SE33 (ACTBP8) oraz amelogeninę. 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 Humatype Chimera Template File. Jako standard wewnętrzny wykorzystano DNA Size Standard 550 znakowany

fluorochromem ROX. Zgodność z rozkładem Hardy-Weinberga (HWE) oraz analizę sprzężeń w parach loci sprawdzano stosując test dokładny Fishera [2] zawarty w oprogramowaniu GDA v1.2 [3]. Dodatkowo obliczono wartości obserwowanej heterozygotyczności, wskaźnika informacji o polimorfizmie (PIC) [4], teoretycznej szansy wykluczenia (MEC) [5] oraz siły dyskryminacji (PD) i prawdopodobieństwa przypadkowej zgodności (MP) [6].

WYNIKI I OMÓWIENIE

Częstości alleli i parametry biostatystyczne obliczone dla 11 badanych markerów mikrosatelitarnych przedstawiono w tabeli 1. Dla wszystkich analizowanych loci rozkłady częstości genotypów były zgodne z rozkładami wyznaczonymi w oparciu o regułę Hardy-Weinberga ($0,1149 < P < 0,9842$). Wyniki testu dokładnego użytego w celu analizy naruszenia równowagi sprzężeń nie wykazały zależności między rozkładami częstości genotypów poszczególnych par loci ($0,0974 < P < 0,9968$). Oceniane loci charakteryzuje się łączną wartością MP wynoszącą $9,67 \times 10^{-15}$ i łączną wartością MEC wynoszącą 0,999999. Nie odnotowano statystycznie znamiennych różnic w rozkładach częstości alleli wszystkich oznaczanych loci między populacją białoruskiej mniejszości narodowej a populacjami Polaków zamieszkujących Polskę pn-wsch. i centralną ($0,2830 < P < 0,9990$) [7, 8] oraz Niemiec ($0,0690 < P < 0,9990$) [9, 10, 11, 12] z wyjątkiem locus D3S1744 ($P=0,0000 \pm 0,0000$) [13]. Brak znamiennych różnic stwierdzono również w rozkładach częstości alleli locus D12S391 między badaną populacją a populacjami Andaluzji (Hiszpania) ($P=0,9300 \pm 0,0081$), Maghrebu (Afryka pn.) ($P=0,9510 \pm 0,0068$) [14], Egiptu ($P=0,8590 \pm 0,0110$), Jemenu ($P=0,3200 \pm 0,0148$), Włoch ($P=0,0960 \pm 0,0093$), Austrii ($P=0,9330 \pm 0,0079$) [15] oraz Madery (Portugalia) ($P=0,5660 \pm 0,0157$) [16], a także w rozkładach częstości alleli locus D10S2325 między badaną populacją a populacją włoską ($P=0,1840 \pm 0,0123$) [17]. Statystyczna niezgodność wystąpiła natomiast między badaną populacją a populacją Włoch w locus D8S1132 ($P=0,0300 \pm 0,0054$) [17] i pd-wsch. Chin w loci D7S1517, D10S2325 i D12S391 ($P=0,0000 \pm 0,0000$) [18].

WNIOSEK

Analizowane systemy wykazują bardzo wysoką informatywność i mogą być przydatne w przy-

Tabela 1. Częstości alleli i parametry biostatystyczne dla 11 loci autosomalnych w próbce populacyjnej białoruskiej mniejszości narodowej.

Table 1. Allele distribution and biostatistical parameters for 11 autosomal STRs in a population sample of Belarussian minority.

	D12S391	D7S1517	D8S1132	D2S1360		D21S2055	SE33		
15	0,025	–	–	–		16,1	0,050	12	0,008
16	0,020	0,005	0,005	–		17,1	0,030	13	0,007
17	0,122	0,005	0,084	–		18,1	0,025	13,2	0,005
17,3	0,018	–	–	–		19,1	0,244	14	0,020
18	0,223	0,055	0,192	–		20,1	0,066	15	0,036
18,3	0,005	–	–	–		21,1	0,020	16	0,056
19	0,120	0,124	0,155	–		22,1	0,005	17	0,065
19,3	0,015	–	–	–		23	0,005	17,3	0,000
20	0,125	0,108	0,134	0,136		25	0,128	18	0,065
21	0,084	0,106	0,162	0,010		26	0,135	18,3	0,005
22	0,108	0,093	0,098	0,295		27	0,015	19	0,066
23	0,056	0,082	0,134	0,166		28	0,005	19,2	0,007
24	0,050	0,136	0,021	0,095		29	0,040	20	0,058
25	0,024	0,235	0,015	0,102		30	0,035	20,2	0,014
26	0,005	0,036	–	0,086		31	0,015	21	0,036
27	–	0,010	–	0,055		32	0,025	21,2	0,032
28	–	0,005	–	0,020		33	0,068	22	0,005
29	–	–	–	0,015		34	0,054	22,2	0,021
30	–	–	–	0,005		35	0,028	23,2	0,059
31	–	–	–	0,015		36	0,005	24	0,000
						37	0,002	24,2	0,015
<i>P</i>	0,1354	0,1231	0,1458	0,8954			0,6528	25,2	0,024
Het	0,890	0,824	0,866	0,876			0,842	26,2	0,030
PIC	0,87	0,85	0,85	0,85			0,84	28	0,062
PD	0,969	0,958	0,964	0,965			0,952	28,2	0,090
MEC	0,696	0,704	0,723	0,694			0,744	29,2	0,062
								30	0,005
								30,2	0,088
								31,2	0,012
								32,2	0,035
								33	0,007
								33,2	0,005
7	–	–	–	–	D5S2500				
8	–	–	–	–	D6S474				
9	0,005	–	0,352	–	D4S2366				
10	0,080	–	0,168	–	D3S1744				
11	0,302	–	0,109	–	D10S2325				
12	0,192	–	0,135	–					
13	0,055	0,248	0,144	0,005					
14	0,040	0,196	0,092	0,080					
15	0,208	0,185	–	0,109					
16	0,108	0,264	–	0,122					
17	0,005	0,102	–	0,284					
18	0,005	0,005	–	0,196					
19	–	–	–	0,134					
20	–	–	–	0,050					
21	–	–	–	0,020					
<i>P</i>	0,1149	0,8421	0,9842	0,5123	0,4223				0,2146
Het	0,808	0,754	0,775	0,797	0,848				0,947
PIC	0,78	0,76	0,74	0,81	0,84				0,94
PD	0,940	0,922	0,909	0,946	0,958				0,988
MEC	0,630	0,612	0,610	0,642	0,716				0,985

P – prawdopodobieństwo testu dokładnego (HWE), Het: heterozygotyczność obserwowana, PIC: wskaźnik informacji o polimorfizmie, PD: siła dyskryminacji, MEC: średnia szansa wykluczenia

P – exact test probability (HWE), Het: observed heterozygosity, PIC: polymorphism information content, PD: power of discrimination, MEC: mean exclusion chance

padkach wymagających rozszerzenia panelu badawczego opartego na systemie CODIS.

PIŚMIENNICTWO

1. Wiegand P., Bajanowski T., Brinkmann B.: PCR typing of debris from fingernails. *Int J Legal Med.* 1993, 106, 81-84.
2. Guo S. W., Thompson E. A.: Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics.* 1992, 48, 361-372.
3. 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>.
4. 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.
5. Brenner C., Morris J. W.: Paternity index calculations in single locus hypervariable DNA probes validation and other studies. *Proceedings from International Symposium of Human Identification.* Omega Corp. 1989, p. 23-53.
6. Jones D. A.: Blood samples: probabilities of discrimination. *J Forensic Sci Soc.* 1972, 12, 355-359.
7. Janica J., Pepiński W., Skawrońska M., Niemcunowicz-Janica A., Koc-Zórawska E.: Polymorphism of 10 autosomal STRs in a population sample of Podlasie (NE Poland)-an extension to the STR core set. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 2007, 57, 248-25.
8. Kuzniar P., Jastrzebska E., Ploski R.: Validation of nine non-CODIS STR loci for forensic use in a population from Central Poland. *Forensic Sci Int.* 2006, 159, 258-260.
9. Schmid D., Anslinger K., Rolf B.: Allele frequencies of the ACTBP2 (=SE33), D18S51, D8S1132, D12S391, D2S1360, D3S1744, D5S2500, D7S1517, D10S2325 and D21S2055 loci in a German population sample. *Forensic Sci Int.* 2005, 151, 303-305.
10. Hering S., Müller E.: New alleles and mutational events in D12S391 and D8S1132: sequence data from an eastern German population. *Forensic Sci Int.* 2001, 124, 187-191.
11. Schröer K., Schmitt C., Staak M.: Analysis of the co-amplified STR loci D1S1656, D12S391 and D18S51: population data and validation study for a highly discriminating triplex-PCR. *Forensic Sci Int.* 2000, 113, 17-20.
12. Dauber E. M., Glock B., Schwartz D. W., Mayr W. R.: Further sequence and length variation at the STR loci HumFES/FPS, HumVWA, HumFGA and D12S391. *Int J Legal Med.* 2000, 113, 76-80.
13. Stein C., Lange T., Ferencik S., Grosse-Wilde H., Henssge C.: German population data of three tetrameric short tandem repeat loci – D3S1744, D12S1090 and D18S849. *Forensic Sci Int.* 1998, 91, 103-107.
14. Farfán M. J., Sanz P., Lareu M. V., Carraçado A.: Population data on the D1S1656 and D12S391 STR loci in Andalusia (south Spain) and the Maghreb (north Africa). *Forensic Sci Int.* 1999, 104, 33-36.
15. Klintschar M., Ricci U., al Hammadi N., Reichenpfader B., Ebner A., Uzielli M. L.: Genetic variation at the STR loci D12S391 and CSF1PO in four populations from Austria, Italy, Egypt and Yemen. *Forensic Sci Int.* 1998, 97, 37-45.
16. Corte-Real F., Souto L., Anjos M. J., Carvalho M., Vieira D. N., Carracedo A., Vide M. C.: Population distribution of six PCR-amplified loci in Madeira Archipelago (Portugal). *Forensic Sci Int.* 1999, 100, 93-99.
17. De Leo D., Turrina S., Marigo M., Tiso N., Danieli G. A.: Italian population data for D1S1656, D3S1358, D8S1132, D10S2325, VWA, FES/FPS and F13A01. *Forensic Sci Int.* 2001, 123, 71-73.
18. Shi M., Yu X., Bai R., Shu X., Zhu G., Lv J., Tu Y.: Genetic polymorphism of 14 non-CODIS STR loci for forensic use in southeast China population. *Forensic Sci Int.* 2008, 174, 77-80.

Adres autorów:

Zakład Medycyny Sądowej UMwB

ul. Waszyngtona 13, 15-269 Białystok

E-mail: pepinski@umwb.edu.pl (W. Pepiński)