

Brookfield JFY, Semeonoff R: Positive identification of an immigration test-case using human DNA Fingerprints. *Nature* 1985, 317, 818-819. -6. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 1985, 314, 67-73. -7. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL: Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 1985, 316, 76-79. -8. Jones DA: Blood samples: Probability of discrimination. *J Forensic Sci Soc* 1972, 12, 355-359. -9. Lewis PO, Zaykin D Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0. Free program distributed by the authors over the internet from the GDA Home Page at <http://chee.unm.edu/gda/>. -10. Nakamura Y, Leppert M., O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M., Martin C, Fujimoto E, Hoff M., Kumlin E, White R: Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 1987, 235,1616-1622.

11. Napierała M: Sekwencje powtarzające się w genomie człowieka w Genom człowieka - największe wyzwanie współczesnej genetyki i medycyny molekularnej - praca zbiorowa pod redakcją W. Krzyżosiaka, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997, 56-69. -12. Napierała M: Mapa genetyczna genomu człowieka w Genom człowieka - największe wyzwanie współczesnej genetyki i medycyny molekularnej - praca zbiorowa pod redakcją W. Krzyżosiaka, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997, 70-88. -13. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Analysis and cloning of eucaryotic genome DNA. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, 16-22. -14. Wong Z, Wilson V, Patel I, Povey S, Jeffreys AJ: Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Ann Hum Genet* 1987, 51, 269-288.

Adres pierwszego autora:
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
ul. M. Curie Skłodowskiej 9
85-094 Bydgoszcz

Marcin Woźniak, Anna Skowron, Jarosław Bednarek

Ocena polimorfizmu *loci* STR chromosomu Y: **DYS19, DYS 389I, DYS389II i DYS 390** w populacji Kujawsko-Pomorskiej

Polymorphism of Y-STR *loci*: DYS19, DYS 389I, DYS389II i DYS 390 in Pomerania - Kujawy Region of Poland

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr hab. K. Śliwka

W pracy określono częstości alleli *loci* DYS19, DYS389I, DYS389II i DYS390. Obliczono zróżnicowanie genetyczne tych *loci* oraz podjęto próbę oceny wewnątrzpopulacyjnych zależności między haplotypami poprzez określenie podobieństwa alleli składających się na poszczególne haplotypy. Porównano również częstości haplotypów populacji kujawsko-pomorskiej z innymi populacjami europejskimi.

This paper is a study of four Y-STR *loci*: DYS19, DYS389I, DYS389II and DYS390 in the population of Pomerania Kujawy region of Poland. The *loci* were amplified together in a quadruplex reaction, amplification products were separated on ABI 377 sequencer and genotyped. Allelic frequencies as well as gene diversity were assessed together and intra-population haplotype similarities. The population's haplotype frequencies were compared with those of other European populations.

WSTĘP

Loci STR zlokalizowane na chromosomie Y (Y-STR) stanowią jedno z najnowszych narzędzi stosowanych w analizie polimorfizmu DNA człowieka. Dzięki dziedziczeniu wyłącznie w linii męskiej i silnemu sprzężeniu genetycznemu połączonemu z wysokim polimorfizmem stanowią one cenne uzupełnienie metod stosowanych dotychczas w badaniach nad rozprzestrzenieniem się ludzkich populacji i zasiedlaniem Ziemi przez nasz gatunek (1). Coraz większego znaczenia nabierają również zastosowania układów mikrosatelitarnych chromosomu Y w medycynie sądowej, szczególnie w przypadkach gwałtów zbiorowych i w szczególnych sprawach związanych z dochodzeniem spornego ojcostwa. Zastosowanie *loci* Y-STR w medycynie sądowej wymaga dokładnego

rozpoznania charakterystyki genetycznej tych *loci* oraz ich zmienności wewnątrz- i międzypopulacyjnej (3).

Celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie 4 *loci* Y-STR: DYS19, DYS389I, DYS389II i DYS390 w populacji kujawsko-pomorskiej oraz porównanie rozkładu haplotypów w tej populacji z innymi populacjami zamieszkującymi Europę.

MATERIAŁY I METODY

Materiał badany stanowił DNA wyizolowany metodą ekstrakcji organicznej (10) z krwi obwodowej pobranej od 208 niespokrewnionych mężczyzn. Ocenę stężenia DNA prowadzono metodą hybrydacyjną z wykorzystaniem zestawu QuantiBlot™ (Perkin Elmer). Sekwencje starterów amplifikujących *loc/DYS19*, *DYS 389I*, *DYS389II* i *DYS 390* wraz z sugerowanymi warunkami amplifikacji uzyskano z literatury (5). Amplifikację prowadzono w objętości 25 μ l, w następujących warunkach: 2U polimerazy Taq (Promega), MgCl₂ 2mM, trójfosforany deoksynukleotydów 0.2 mM każdy, BSA 0.4 mM, startery dla *locus* DYS19 0.24 μ M, DYS 389I/II 0.24 μ M, DYS390 0.16 μ M. Warunki amplifikacji: denaturacja wstępna 95°C, 1min.; denaturacja właściwa 94°C, 1 min.; annealing starterów 55 °C, 1 min.; elongacja 72 °C 2 min.; 29 cykli; elongacja końcowa 72 °C, 7 min. 1 uJ produktu amplifikacji oraz 0.5 uJ wewnętrznego standardu wielkości ILS600 (Promega) dodawano do 1.5 uJ mieszaniny dextran blue/formamid i poddawano elektroforezie. Rozdział produktów PCR prowadzono w 5%, denaturującym żelu poliakrylamidowym (stosunek akrylamid/bisakrylamid 19:1, 7M mocznik) na automatycznym sekwenatorze ABI377 (Applied Biosystems), wykorzystując bufor boranowy. Analizę danych zebranych podczas elektroforezy prowadzono przy pomocy oprogramowania GeneScan™ v. 3.1 oraz Genotyper™ v. 2.0 (Applied Biosystems). Oznaczenie haplotypów poszczególnych *loci* przeprowadzono wykorzystując 6 próbek referencyjnych o znanym haplocie, otrzymanych dzięki uprzejmości M. Kaysera (Uniwersytet Humboldta, Berlin). Dane dla populacji innych niż kujawsko-pomorska zaczerpnięto z Europejskiej Bazy Danych Haplotypów Chromosomu Y (Y-chromosome Haplotype Reference Database - YHRD) dostępnej w Internecie pod adresem <http://ystr.charite.de> (8). Współczynnik różnicowania genetycznego (D) obliczono korzystając ze wzoru $D=1-1/(\pi_i)^2$ gdzie π_i - częstość i-tego allelu (11).

WYNIKI

Częstości alleli badanych *loci* STR chromosomu Y oraz wyniki obliczeń ich różnicowania genetycznego przedstawiono w Tabeli I

Tabela I. Częstości alleli badanych *loci* STR chromosomu Y (D - współczynnik różnicowania genetycznego danego *locus*).

Table I. Allele frequencies for Y-STR *loci* investigated (D - gene diversity for particular *locus*).

Allel	DYS 19	Allel	DYS 389I	Allel	DYS 389II	Allel	DYS 390
13	0,0481	11	0,0048	27	0,0096	22	0,1154
14	0,1971	12	0,1827	28	0,1202	23	0,1154
15	0,2115	13	0,6971	29	0,2788	24	0,2788
16	0,3269	14	0,1106	30	0,3798	25	0,4519
17	0,2115	15	0,0048	31	0,1538	26	0,0385
18	0,0048			32	0,0577		
D =	0,762	D =	0.468	D =	0.736	D =	0.690

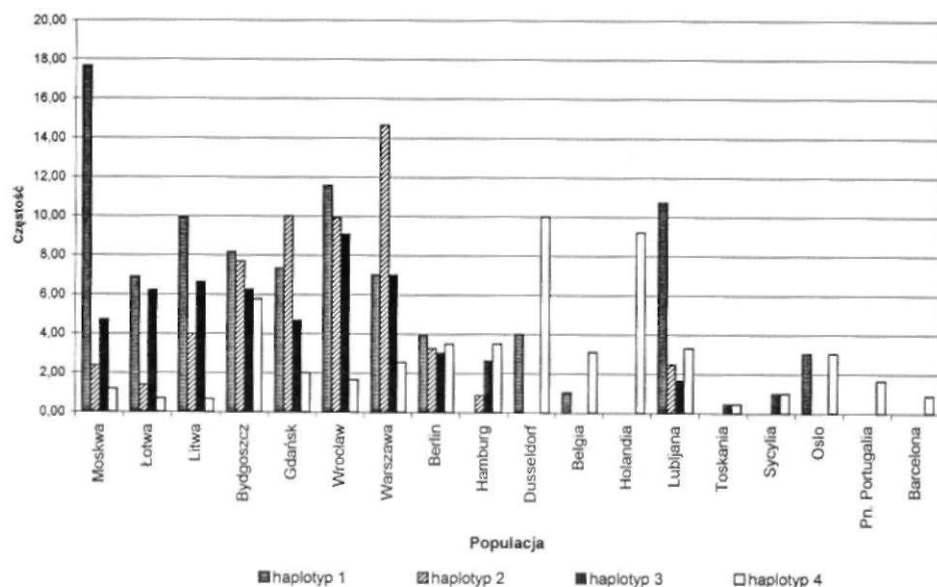
Allele *loci* DYS19, DYS389I, DYS389II i DYS390 występujące w populacji kujawsko-pomorskiej są identyczne z allelami obserwowanymi w innych populacjach na świecie, choć allel 18 *locus* DYS19, wykryty w naszej populacji, występuje w innych populacjach europejskich bardzo rzadko, tylko 6 razy na 7784 próbek zarejestrowanych w bazie YHRD, w tym w dwóch innych populacjach z terenu Polski.

Wśród badanych 208 próbek DNA stwierdzono występowanie 85 odmiennych haplotypów chromosomu Y, określonych przez allele *loci* DYS19, DYS389I, DYS389II i DYS 390, wśród których cztery występowały z częstością większą niż 5%. Pięćdziesiąt haplotypów pojawiło się tylko raz w badanej próbce. Wszystkie oznaczone haplotypy oraz częstości ich występowania przedstawiono w Tabeli II.

Na podstawie otrzymanych danych podjęto próbę określenia wzajemnych zależności pomiędzy haplotypami *loci* DYS19, DYS389I, DYS389II i DYS390 występującymi w populacji kujawsko-pomorskiej. Dla tych haplotypów, które zaobserwowano w badanej próbce co najmniej 2 razy wykreślono diagram ilustrujący podobieństwa pomiędzy nimi (Rycina 1). Przyjęto, że dwa dowolne haplotypy są podobne, jeśli różnią się między sobą wyłącznie w jednym *locus* a różnicę między allelami stanowi dla danej pary haplotypów nie więcej niż jedna jednostka repetytywna.

Na podstawie analizy diagramu podobieństw stwierdzono, że haplotypy *loci* DYS19, DYS389I, DYS389II i DYS390 występujące najczęściej w populacji kujawsko-pomorskiej (haplotypy nr 1, 2 i 3 wg numeracji z Tabeli II) charakteryzują się wysokim wzajemnym podobieństwem oraz są podobne do innych, rzadszych haplotypów występujących w tej populacji. Zaobserwowano również występowanie grupy haplotypów wzajemnie do siebie podobnych, które odróżniały się od pozostałych haplotypów w badanej populacji (haplotypy nr 4, 8, 14, 20, 22, 23, 24 i 25). Dla haplotypów oznaczonych numerami: 9, 16, 21, 30 i 35 nie znaleziono w obrębie badanej grupy żadnych haplotypów podobnych, choć haplotypy 21, 30 i 35 wykazywały podobieństwo do haplotypów oznaczonych odpowiednio numerami: 46, 48 i 80, które, ze względu na jednokrotne wystąpienie w badanej próbce, nie zostały ujęte na diagramie.

Dla czterech haplotypów *loci* DYS 19, DYS389I, DYS389II i DYS390 występujących najczęściej w populacji kujawsko-pomorskiej uzyskano z bazy YHRD dane opisujące ich występowanie w innych populacjach. Doбору populacji dokonano na podstawie kryteriów geograficznych i etnicznych tak, aby stanowiły one możliwie reprezentatywną próbkę populacji europejskich. Wyniki porównania częstości występowania wybranych haplotypów na terenie Europy przedstawiono na Rycinie 2.



Ryc. 2. Porównanie dystrybucji najczęstszych w populacji kujawsko-pomorskiej haplotypów w wybranych populacjach europejskich.

Fig. 2. A comparison of haplotype distribution in different European populations for the four most common haplotypes in the Pomerania - Kujawy population sample.

DYSKUSJA

Loci mikrosatelitarne chromosomu Y, mimo że pod wieloma względami podobne do *loci* autosomalnych, spełniają odmienną od nich funkcję w badaniach z zakresu identyfikacji osobniczej. Ze względu na występowanie silnego sprzężenia genetycznego i brak rekombinacji, Y-STR nie są tak efektywnym narzędziem identyfikacyjnym, jak autosomalne *loci* STR (4). Wymienione cechy sprawiają jednak, że Y-STR mogą spełniać pewne funkcje, które czynią je użytecznymi. Rozwój technik analizy mikrosatelitów chromosomu Y umożliwił opracowanie szybkich metod identyfikacji linii ojcowskiej opartych na technice PCR i rozdziale elektroforetycznym z wykorzystaniem fluorescencyjnych metod detekcji fragmentów DNA. Możliwości te znajdują szczególne zastosowa-

nie w trudnych przypadkach analizy pokrewieństwa, gdy dostępny jest wyłącznie materiał porównawczy od osób niespokrewnionych w pierwszej linii (6). Możliwości takie do niedawna oferowała jedynie analiza DNA mitochondrialnego (2). Ze względu na niewielkie rozmiary alleli Y-STR możliwa jest ich amplifikacja ze zdegradowanego DNA co czyni je doskonałym narzędziem wspomagającym i uzupełniającym analizę genetyczną śladów biologicznych (7). Inne zastosowania *loci* mikrosatelitarnych chromosomu Y obejmują wykorzystanie danych populacyjnych uzyskanych dla tych *loci* do wzbogacania wiedzy o pochodzeniu ludzkich zbiorowisk zamieszkujących określony region geograficzny (9). Jednocześnie, ze względu na czynniki biologiczne, historyczne i kulturowe regulujące przepływ chromosomów Y między pokoleniami, obecnie istniejące populacje wykazują duże zróżnicowanie pod względem częstości występowania poszczególnych haplotypów chromosomu Y (13). Różnice te mogą być tak duże, że w niektórych przypadkach możliwe jest określenie na podstawie markerów genetycznych chromosomu Y regionu geograficznego lub grupy etnicznej, z której pochodzi dany mężczyzna (4).

W zastosowaniach Y-STR dla potrzeb identyfikacji osobniczej na plan pierwszy wybija się zatem potrzeba szczegółowego poznania struktury populacji, z której pochodzą mężczyźni, których DNA jest przedmiotem badań. Częstości alleli *loci* DYS19, DYS389I, DYS389II i DYS390 oznaczone w populacji kujawsko-pomorskiej różnią się od częstości opublikowanych dla innych populacji (5), natomiast zróżnicowanie genetyczne tych *loci* osiąga wartości zbliżone. Zjawisko zróżnicowania częstości alleli *loci* Y-STR w różnych populacjach jest powszechnie obserwowane i wiąże się ze specyficznym sposobem dziedziczenia chromosomu Y (13).

Wewnętrzna struktura populacji uzależniona jest od zmian liczebności populacji efektywnej, ewentualnego dopływu lub ubytku chromosomów Y (w wyniku migracji, chorób, wojen itp.) oraz od częstotliwości mutacji w obrębie analizowanych markerów genetycznych (4). Przeprowadzona analiza podobieństwa haplotypów w populacji kujawsko-pomorskiej wykazała istnienie silnych powiązań między haplotypami najczęstszymi w tej populacji. Wynik taki może być efektem rzeczywistych związków pomiędzy poszczególnymi haplotypami, wynikających z przechodzenia jednych haplotypów w inne na drodze mutacji, ale może również odzwierciedlać inne zjawiska, jak np. domieszki obcych haplotypów, które są identyczne bądź podobne do haplotypów już występujących w populacji. O występowaniu takiego zjawiska może świadczyć obecność w badanej populacji całej grupy haplotypów podobnych do siebie i różnych od pozostałych jak również obecność haplotypów, które nie wykazują podobieństwa do żadnego z pozostałych haplotypów występujących w badanej populacji. Należy również zauważyć, że przyjęty na potrzeby niniejszej pracy model powstawania nowych haplotypów *loci* Y-STR na drodze insercji bądź delekcji pojedynczych powtórzeń, choć najbardziej prawdopodobny, nie musi być prawdziwy dla każdego przypadku powstania nowego haplotypu (12). Nie można również wykluczyć, że haplotypy, które są identyczne w zakresie badanych *loci*, po przeprowadzeniu analizy dodatkowych *loci* Y-STR zostaną zakwalifikowane do odmiennych grup. Analiza dodatkowych *loci* Y-STR dla badanego zestawu próbek jest obecnie w toku.

Ze względu na, spowodowane sprzężeniem genetycznym, wspólne dziedziczenie całych zestawów alleli chromosomu Y, w przypadku porównań międzypopulacyjnych konieczna jest analiza różnic częstości całych haplotypów. Przeprowadzone porównania międzypopulacyjne wykazały, że haplotypy, które są najczęstsze w populacji kujawsko-pomorskiej, występują również stosunkowo często w populacjach Europy wschodniej i centralnej oraz w populacjach Słowian, natomiast przeważnie nie występują (lub ich częstości są znacząco odmienne), w populacjach Europy Południowej. Na szczególną uwagę zasługuje haplotyp oznaczony w Tabeli II numerem 2, którego częstość występowania w populacjach Polskich (Bydgoszcz, Gdańsk, Wrocław i Warszawa) jest wyższa niż w pozostałych badanych populacjach Europy.

Przedstawione wyniki są kolejnym etapem badań mających na celu możliwie pełne zidentyfikowanie polimorfizmu ludzkiego chromosomu Y w populacji Pomorza i Kujaw. Wspomniane już rozszerzenie prowadzonych badań o kolejne *loci* oraz zwiększenie ilości osobników w badanej próbce powinno pozwolić na pełniejsze zrozumienie zróżnicowania genetycznego tego chromosomu i lepsze jego wykorzystanie w dziedzinie identyfikacji osobniczej.

PIŚMIENNICTWO

1. Casanová M., Leroy P., Boucekkine C, Weissenbach J. Bishop C, Fellous M., Purello M., Fiori G., Siniscalco M. A Human Y-linked DNA Polymorphism and its Potential for Estimating Genetic and Evolutionary Distance. *Science* 1985, 230, 1403-1406. -2. Gili P., Ivanov P.L., Kimpton C, Piercy R., Benson N., Tully G., Evett I., Hagelberg E., Sullivan K. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature Genetics* 1994, 6, 130-135. -3. Jobling M.A., Pandya A., Tyler-Smith C, The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *International Journal of Legal Medicine*. 1997, 110, 118-124. -4. Jobling M., Tyler-Smith C. Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. *Trends in Genetics* 1995, 11, 449-455. -5. Kayser M. i wsp. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *International Journal of Legal Medicine* 1997, 110, 125-133. -6. Kayser M., Kruger C, Nagy M., Geserick G., de Knijf P., Roewer L. Y-chromosomal DNA - analysis in paternity testing: experiences and recommendations. *Progress in Forensic Genetics*, 1998, 7, 494-496. -7. Prinz M., Boli K., Baum H., Shaler B. Multiplexing of Y chromosome specific STRs and performance for mixed samples. *Forensic Science International*, 1997, 85, 209-218. -8. Roewer L. i wsp. Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes. *Forensic Science International* 2001, 118, 106-113. -9. Roewer L, Kayser M., Deltjes P., Nagy M., Bakker E., Krawczak M., de Knijf P., Analysis of molecular variance (AMOVA) of Y - chromosome - specific microsatellites in two closely related human populations. *Human Molecular Genetics*, 1996, 5, 1029 - 1033. 10. Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T (1989) Analysis and cloning of eucaryotic genomic DNA. *Molecular cloning, a laboratory manual*, wyd. Cold Spring Harbor 1989, 9.16-9.23.

11. Weir B. w *Genetic Data Analysis* II wyd. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts 1996, 150-156. -12. Weber JL, Wong C. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 1993, 8, 1123-1128. -13. Santos F. R., Gerelsaikhan T., Munkhtuja B., Oyunsuren T., Eppel J. T., Pena S. D. J., Geographic differences in the allele frequencies of the human Y - linked tetranucleotide polymorphism DYS19. *Human Genetics* 1996, 97, 309-313.

Adres pierwszego autora:
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
ul. M. Curie Skłodowskiej 9
85-094 Bydgoszcz