

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

Polimorfizm STR niekodującego regionu genu ludzkiego hormonu wzrostu (HUMGHCSA) i jego wykorzystanie w identyfikacji osobniczej – doniesienie wstępne¹

STR polymorphism of the non-coding human growth hormone gene (HUMGHCSA) and its use in personal identification – 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.

Locus HUMGHCSA, zlokalizowane w obrębie niekodującego regionu genu ludzkiego hormonu wzrostu położonego na chromosomie 17, wykazujące polimorfizm ilości powtórek dwu- i czteronukleotydowych (CT i CTTT), a także polimorfizm spowodowany podstawieniem nukleotydu, jest jednym z najbardziej polimorficznych markerów typu STR. Celem niniejszej pracy było utworzenie systemu fluorescencyjnej analizy dla automatycznego sekwenatora, sprawdzenie jego wiarygodności i opracowanie biostatystycznych parametrów przydatności w badaniach kryminalistycznych dla tego układu. Badania przeprowadzone na grupie 200 niespokrewnionych osób wykazały obecność 24 różnych alleli o długości od 221 do 279 pz. Obliczenia biostatystyczne wykazały, że heterozygotyczność oczekiwana wynosi 0,898634 +/- 0,015091, PD 0,980586, PIC 0,887709, PE 0,792767, PE dla dwójek bez matki 0,656701 a średnia szansa ojcostwa 4,932625. Takie wyniki wskazują na dużą przydatność badanego locus HUMGHCSA w badaniach identyfikacyjnych.

The HUMGHCSA locus, located within the non-coding region of the human growth hormone gene on chromosome 17, exhibiting polymorphism of the number of repeats of two and four nucleotide motifs (CT and CTTT), but also polymorphism caused by nucleotide substitution, is one of the most polymorphic STR markers.

The purpose of this study was to report the creation of a system of fluorescent analysis for an automatic sequencer, the testing of its credibility and the elaboration of biostatistical parameters of its usefulness in forensic examinations of this system. The studies, carried out on a group of 200 non-related persons, showed the presence of 24 different alleles, of 221 to 279 bp in length. Biostatistical calculations showed that expected heterozygosity was 0,898634 +/- 0,015091, PD 0,980586, PIC 0,887709, PE 0,792767, PE for motherless cases 0,656701, and the average paternity index 4,932625. Such results indicate great usefulness, for identification examinations, of the HUMGHCSA locus studied.

Słowa kluczowe: STR, HUMGHCSA, dane populacyjne

Key words: STR, HUMGHCSA, population data

WSTĘP

Genotypowanie układów STR można przeprowadzić poprzez amplifikację DNA genomowego z zastosowaniem reakcji łańcuchowej polimerazy, primerów specyficznych dla locus, rozdziału powielonych fragmentów drogą elektroforezy i wizualiza-

¹ Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2005-2006 jako projekt badawczy.

cji, np. za pomocą barwnika fluorescencyjnego. Primery dla kilku loci STR można łączyć w jednej reakcji multipleksowej, co pozwala na efektywniejsze genotypowanie i wykorzystanie mniejszej ilości DNA, niż w przypadku, gdyby każde locus badane było oddzielnie [1, 2]. Badanie DNA za pomocą komercyjnie dostępnych zestawów multipleksowych pozwala na osiągnięcie bardzo dużej, i zazwyczaj satysfakcjonującej, siły dyskryminacji w rutynowej identyfikacji osobniczej. Jednak w niektórych przypadkach konieczne jest rozszerzenie badań o dodatkowe wysokopolimorficzne markery STR. Do takich markerów należą na przykład wykorzystywane już FGA, ACTBP 2, Penta D i Penta E. Jednak nadal prowadzone są prace nad poszukiwaniem i wdrażaniem nowych markerów, szczególnie tych niesprzężonych z dotychczas używanymi. Takie wysokopolimorficzne loci są użyteczne w identyfikacji śladów biologicznych, w badaniach sporne go ojcostwa i identyfikacji nieznanymi zwłok. Mogą również znaleźć zastosowanie jako markery w screeningach masowych, np. przy eliminacji osób niezwiązanych z przestępstwem.

Jednym z takich markerów jest locus HUMGHCSA, zlokalizowane w obrębie niekodującego regionu genu ludzkiego hormonu wzrostu położonego na chromosomie 17, wykazujące polimorfizm ilości powtórek dwu- i czteronukleotydowych (CT i CTTT), a także polimorfizm spowodowany podstawieniem nukleotydu. 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 [3, 4]. Na wykorzystanie sekwencji primerów do obecnych badań uzyskaliśmy zgodę prof. Andrzeja Płucienniczaka.

Primery te posiadają następującą sekwencję: 5'-GACAGAATGA GACTCCAAC T G-3' i 5'-CAGACAGGTAGTGTGGTGT -3'. Zakres drabiny allelicznej wynosi od 221 do 279 par zasad. Polimorficzny fragment znajduje się w miejscu oznaczonym w Banku Genów HUMGHCSA 11027-11290.

CEL PRACY

Celem pracy było utworzenie systemu fluorescencyjnej analizy dla automatycznego sekwencjatora, sprawdzenie jego wiarygodności i opracowanie biostatystycznych parametrów przydatności w badaniach kryminalistycznych dla układu STR w obrębie niekodującego regionu genu ludzkiego hormonu wzrostu (HUMGHCSA).

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 oznaczano metodą hybrydyzacji z sondą D17S1 swoistą dla DNA naczelnych (Quantiblot, PE, USA) z kolorymetryczną metodą detekcji lub pomiarem fluorymetrycznym. Następnie przeprowadzono optymalizację reakcji amplifikacji PCR, tj. stężenia starterów, matrycowego DNA, Tag polimerazy, warunków termicznych (temperatura hybrydyzacji, ilość cykli). Reakcję PCR prowadzono w aparacie „GeneAmp PCR System 9700” firmy Applied Biosystems w objętości 25 µl. Wydajność amplifikacji badano przy zmiennym stężeniu matrycowego DNA wynoszącym odpowiednio 0,25 ng, 0,5 ng, 1 ng, 2 ng, 5 ng, 10 ng i 25 ng. Produkt reakcji uzyskano w całym zastosowanym zakresie stężeń DNA, a ilość produktu była wprost proporcjonalna do ilości matrycy. Przy stężeniach 10 ng i 25 ng reakcja PCR przebiegała ze zbyt dużą wydajnością i zaczęły pojawiać się niespecyficzne produkty reakcji. Optymalne warunki amplifikacji ustalono jako: 1x PCR Buffer (Promega Co.), 1,5 µl MgCl₂ 25 mM, 0,2 µl dNTPs 0,25 mM (Promega Co.), primer F/R 4 nM, 1 U Taq DNA Polymerase (Promega Co.), 2,5-5 ng genomowego DNA. Optymalny profil temperaturowy reakcji: denaturacja wstępna 94 stopnie C-2 min., następnie 32 cykle: 94 stopnie C – 30 sekund, 64 stopnie C – 30 sekund, 72 stopnie C – 30 sekund, końcowe wydłużanie 72 stopnie C – 15 min. Do amplifikacji wykorzystano startery o sekwencji:

F: 5'-FAM -GACAGAATGA GACTCCAAC T G – 3'

R: 5'-CAGAACAGGTAGTGTGGTGT – 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 [5] i DLP [6], do których dane przygotowano w formie pliku komputerowego w standardzie NEXUS [7]. Przy użyciu tych programów obliczono heterozygotyczność obserwowaną i oczekiwaną oraz jej błąd [8], siłę dyskryminacji [9], współczynnik informacji o polimorfizmie [10], siłę wykluczenia dla pełnych [11] i niepełnych trójek [12], jak

również minimalną i maksymalną [13] oraz średnią szansę ojcostwa [14].

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

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Analiza 200 próbek DNA pochodzących od kobiet i mężczyzn z populacji polskiej wykazała obecność 24 różnych alleli o wielkości od 221 do 279 pz. Rozkład częstości alleli był zgodny z rozkładem częstości wyznaczonym w oparciu o prawo Hardy-Weinberga ($p=0,567500$).

Wielkości fragmentów DNA zaobserwowanych w grupie badanej w locus HUMGHCSA oraz ich częstości przedstawia Tabela I, a parametry biostatystyczne określające stopień polimorfizmu tego locus przedstawia Tabela II.

Tabela I. Rozkład częstości alleli HUMGHCSA w populacji polskiej.

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

Allel	Ilość	Częstość
279	2	0,0050
275	5	0,0125
271	2	0,0050
269	1	0,0025
267	3	0,0075
261	6	0,0150
259	1	0,0025
257	35	0,0875
253	49	0,1225
251	1	0,0025
249	72	0,1800
247	4	0,0100
245	55	0,1375
243	12	0,0300
241	54	0,1350
239	13	0,0325
237	29	0,0725
235	9	0,0225
233	17	0,0425
231	7	0,0175
229	10	0,0250
225	4	0,0100
223	4	0,0100
221	5	0,0125
Razem	400	1,0000

Tabela II. Parametry biostatystyczne określające stopień polimorfizmu locus HUMGHCSA.

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

HUMGHCSA	
Ilość osób w populacji	200
Ilość rodzajów alleli	24
Heterozygotyczność obserwowana	0,905000
Heterozygotyczność oczekiwana	0,898634
Błąd heterozygotyczności oczekiwanej	0,015091
Siła dyskryminacji (PD)	0,980586
Współczynnik informacji o polimorfizmie (PIC)	0,887709
Siła wykluczenia dla pełnych trójek (PE)	0,792767
Siła wykluczenia dla dwójek bez matki	0,656701
Minimalna szansa ojcostwa	1,574803
Średnia szansa ojcostwa (TPI)	4,932625
Maksymalna szansa ojcostwa	400,000000

Locus HUMGHCSA charakteryzuje się bardzo wysoką jak na loci STR liczbą alleli, co skutkuje bardzo dobrymi wartościami parametrów biostatystycznych określających stopień polimorfizmu, w porównaniu do innych typowych loci STR [15, 16, 17]. Jedynie wyjątkowo spotyka się inne – bardziej polimorficzne – loci STR, jak np. ACTBP2, w którym opisano aż 41 różnych alleli [18].

Skonstruowanie i zoptymalizowanie systemu fluorescencyjnej analizy locus HUMGHCSA stwarza możliwość wyodrębnienia nowego markera genetycznego o bardzo dużej liczbie alleli (24) i wysokiej wartości PD (0,980586).

W kolejnych etapach badań autorzy zamierzają zsekwencjonować zidentyfikowane allele oraz zaproponować ich nomenklaturę zgodną z ilością powtórzeń opartą o wytyczne ISFG. Dla pełnego zoptymalizowania locus HUMGHCSA skonstruowana zostanie też drabina i przeprowadzona będzie analiza większej populacji. Ponadto należy zauważyć, że na chromosomie 17 znajdują się też inne markery genetyczne (D17S976, D178S26, D17S79, D17S5), ale nie są one rutynowo wykorzystywane w badaniach medyczno-sądowych. Jednak przed włączeniem locus HUMGHCSA do zestawu multipleksowego zawierającego markery z chromosomu 17 należało będzie też sprawdzić czy segregacja ich jest niezależna. Będzie to przedmiotem dalszych badań.

PIŚMIENNICTWO

1. Lins A. M., Sprecher C. J., Puers C. i Schumm J. W.: Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci – silver stain and fluorescence detection. *Biotechniques* 1996, 20, 882-889.
2. Ricciardone M. D., Lins A. M., Schumm J. W. i Holland M. M.: Multiplex systems for the amplification of short tandem repeat loci: evaluation of laser fluorescence detection. *Biotechniques* 1997, 23, 742-747.
3. Płucienniczak A., Płucienniczak G., Mikiewicz Mickiewicz., Jagiełło A., Dąbrowska H., Wojtuszek E. i Chmiel A.: Oligonukleotydowe startery, sposób analizy materiału genetycznego oraz zestaw do analizy materiału genetycznego. Zgłoszenia patentowe nr 327759. *Biuletyn Urzędu Patentowego RP* 2000, 3, 681.
4. Płucienniczak A., Płucienniczak G., Mikiewicz Mickiewicz., Jagiełło A., Dąbrowska H., Wojtuszek E. i Chmiel A.: Oligonukleotydowe startery, sposób analizy materiału genetycznego oraz zestaw do analizy materiału genetycznego. Patent nr 187335. *Wiadomości Urzędu Patentowego RP* 2004, 6, 1046.
5. 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>.
6. Berent J. i Szram S.: DLP – a computer program for calculation of discrete locus parameters. *Forensic Sci.* 2003, 1, 46-47.
7. Maddison D. R., Swofford D. L. i Maddison W. P.: NEXUS: an extensive file format for systematic information. *Syst. Biol.* 1997, 46, 590-621.
8. Nei M. i Roychoudhury A. K.: Sampling variants of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 1974, 76, 379-390.
9. National Research Council Report II. The Evaluation of Forensic DNA Evidence. National Academy Press, Washington, D.C. 1996, pp.96-97.
10. 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.
11. Weir B. S.: Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts 1996, pp.209-211.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Czarny J.: Population genetics of the STRs D3S1358, FGA, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51 and D19S433 in the Pomerania-Kujawy region of Poland. *Forensic Sci. Int.* 2002, 125, 90-92.
16. Czarny J., Grzybowski T., Derenko M. V., Boris A. M., Miścicka-Śliwka D.: Genetic variation of 15 STR loci (D3S1358, vWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, and D19S433) in populations of north and central Poland. *Forensic Sci. Int.* 2005, 147, 97-100.
17. Miścicka-Śliwka D., Czarny J., Grzybowski T., Woźniak M.: Population genetics of the STRs vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, LPL, F13B, FESFPS, F13A01 and ACTBP2 in the Pomerania-Kujawy region of Poland. *Forensic Sci. Int.* 2001, 119, 110-122.
18. Grzybowski T.: Polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnej w obrębie drugiego ludzkiego pseudogenu beta-aktyny (HUMACTBP2) i jego zastosowanie w identyfikacji osobniczej. Rozprawa doktorska. Akademia Medyczna im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Bydgoszcz 1998.

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