

**Jerzy Janica<sup>1</sup>, Witold Pepiński<sup>1</sup>, Małgorzata Skawrońska<sup>1</sup>, Anna Niemcunowicz-Janica<sup>1</sup>, Ewa Koc-Żurawska<sup>1</sup>, Ireneusz Sołtyszewski<sup>2</sup>**

## Polimorfizm czterech loci STR na chromosomie X w próbce populacyjnej białoruskiej mniejszości narodowej zamieszkującej region Podlasia

### **Polymorphism of four X-chromosomal STRs in a population sample of Belarusian minority residing in Podlasie (NE Poland)**

<sup>1</sup> Z Zakładu Medycyny Sądowej AM w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. J. Janica

<sup>2</sup> Z Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego KGP w Warszawie

Dyrektor: insp. dr inż. A. Filewicz

Celem pracy jest określenie częstości alleli czterech loci STR zlokalizowanych na chromosomie X człowieka oraz obliczenie parametrów ich przydatności w badaniach medyczno-sądowych na podstawie badania próbki populacyjnej 294 niespokrewnionych osób obojga płci (191 mężczyzn i 103 kobiety), należących do białoruskiej mniejszości narodowej zamieszkującej region Podlasia. Obserwowany rozkład częstości genotypów analizowanych loci w próbce populacyjnej kobiet znajduje się w równowadze Hardy-Weinberga. Obliczone parametry biostatystyczne wskazują na dużą przydatność analizowanego zestawu w przypadkach, gdy markery autosomalne nie dostarczają jednoznacznych wyników dla ustalenia pokrewieństwa.

The objective of the paper is to determine the allele frequencies for four X-chromosomal STRs determined in a population sample of 294 unrelated volunteers (191 males and 103 females) belonging to the Belarusian minority residing in northeastern Poland. A commercially available kit Mentype Argus X-UL (Biotype AG, Germany) was used to co-amplify X-STR loci: DXS8378, DXS7132, HPRTB and DXS7423. Electrophoresis and typing were performed by automated fluorescent detection in an ABI 310 Genetic Analyzer. The genotype distributions among the females conformed to HWE for all the analyzed loci. The evaluated quadruplex is a potential extension to a battery of autosomal systems in forensic applications,

particularly in kinship analysis and in casework samples from sexual assaults.

**Słowa kluczowe:** STR, chromosom X, genetyka populacyjna, Białorusini, Podlasie  
**Key words:** STRs, chromosome X, population genetics, Belarusians, Northeastern Poland

#### WSTĘP

Wschodnia część obszaru wchodzącego obecnie w skład woj. podlaskiego została włączona do państwa polskiego dopiero w XX wieku. Ważną cechą różnicującą miejscową ludność jest przynależność wyznaniowa. Populacja polskojęzyczna jest wyznania rzymskokatolickiego, zaś grupy posługujące się dialektami wschodniosłowiańskimi są z reguły związane z prawosławiem. Tożsamość białoruska najsilniej zaznacza się wśród ludności o słabym poziomie wykształcenia i zamieszkującej na wsi. Podczas narodowego spisu powszechnego ludności i mieszkań w 2002 roku narodowość białoruską zadeklarowało 48 793 obywateli RP, w tym 46 041 w województwie podlaskim. Na podstawie badań demograficznych przeprowadzonych w tym regionie kilka lat wcześniej ujawniono, że co naj-

mniej 30 % prawosławnych uważa się za Białorusinów, z czego wynika, że zadeklarowani Białorusini mogą stanowić tu nawet 75 000 osób [1]. Analiza polimorficznych loci specyficznych dla chromosomu X może być przydatna w ustalaniu pokrewieństwa (dziedziczenie matka-syn, ojciec-córka) oraz badaniach materiału dowodowego w przestępstwach o podłożu seksualnym. Celem pracy było zbadanie częstości alleli czterech loci zlokalizowanych na chromosomie X człowieka oraz wykonanie analizy parametrów ich przydatności w badaniach medyczno-sądowych.

## MATERIAŁ I METODY

Wymazy nabłonka jamy ustnej pobrano od 294 osób należących do białoruskiej mniejszości narodowej zamieszkującej region Podlasia (103 kobiety i 191 mężczyzn). W celu określenia częstości mutacji wykonano badanie tripletów w 110 sprawach o dochodzenie ojcostwa obejmujących potomstwo

58 chłopców i 52 dziewczynek, w których ojcostwo potwierdzono na podstawie badania loci autosomalnych na poziomie prawdopodobieństwa powyżej 99,999 %. DNA izolowano przy użyciu metody z cheleksem 100 i proteinazą K [2]. Ilość DNA oceniano metodą spektrofotometryczną. Matryce DNA w ilości 0,5-1 ng amplifikowano zgodnie z instrukcją producenta (Biotype AG, Niemcy) w termocyklerze PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) stosując zestaw Menta Argus X-UL pozwalający na koamplifikację i detekcję czterech loci: DXS8378, DXS7132, HPRTB i DXS7423. Elektroforezę i oznaczanie alleli 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 Menta Argus X-UL Template File. Jako standard wewnętrzny wykorzystano DNA Size Standard 400HD znakowany fluorochromem ROX. Częstości alleli każdego locus obliczono oddzielnie dla kobiet i dla mężczyzn (odpowiednio 206 i 191 chromosomów). Porównanie rozkładów częstości alleli

Tabela I. Częstości alleli i parametry biostatystyczne dla czterech loci STR na chromosomie X w próbce populacyjnej mniejszości białoruskiej zamieszkującej region Podlasia.

Table I. Allele distribution and biostatistical parameters for 4 X-chromosomal STR loci in a population sample of Belarusian minority residing in northeastern Poland.

Allele	DXS8378			HPRTB			DXS7423			DXS7132		
	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T
8				0,0105	-	0,0050						
9	0,0157	0,0049	0,0101	0,0262	0,0388	0,0327						
10	0,3298	0,3495	0,3401	0,0209	0,0049	0,0126						
11	0,3194	0,3835	0,3526	0,1257	0,1456	0,1360				-	0,0097	0,0050
12	0,2880	0,2330	0,2594	0,2827	0,3058	0,2947				0,0890	0,1117	0,1008
13	0,0471	0,0291	0,0378	0,2618	0,2621	0,2620	0,1309	0,0922	0,1108	0,3089	0,2864	0,2972
14				0,2147	0,2087	0,2116	0,3089	0,4175	0,3652	0,3979	0,3786	0,3879
15				0,0419	0,0097	0,0252	0,4084	0,3932	0,4005	0,1728	0,1796	0,1763
16				0,0157	0,0243	0,0202	0,1204	0,0825	0,1008	0,0314	0,0243	0,0277
17							0,0314	0,0146	0,0227		0,0097	0,0050
<i>P</i>	0,7922			0,2378			0,2222			0,0734		
Ho	0,67			0,77			0,73			0,66		
He	0,68			0,77			0,73			0,63		
PIC	0,61			0,73			0,68			0,59		
MEC	0,6292			0,7447			0,6267			0,6717		
PE	0,4830			0,6135			0,4819			0,5294		
DP <sub>M</sub>	0,7038			0,7864			0,7052			0,7075		
DP <sub>F</sub>	0,8290			0,7708			0,8171			0,8817		

M: mężczyźni, F: kobiety, T: łącznie, *P*: prawdopodobieństwo testu dokładnego, Ho: heterozygotyczność obserwowana, He: heterozygotyczność oczekiwana, PIC: wskaźnik informacji o polimorfizmie, MEC: teoretyczna szansa wykluczenia, PE: oczekiwane prawdopodobieństwo wykluczenia (w parach ojciec/córka), DP<sub>M</sub>: siła dyskryminacji u mężczyzn, DP<sub>F</sub>: siła dyskryminacji u kobiet

M: males, F: females, T: combined, *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<sub>M</sub>: discrimination power in males, DP<sub>F</sub>: discrimination power in females

w obu grupach przeprowadzono posługując się tabelą kontyngencji RxC [3]. Zgodność z rozkładem Hardy-Weinberga (HWE) oraz równowagę sprzężeń w poszczególnych parach loci sprawdzano stosując test dokładny Fishera [4] zawarty w oprogramowaniu GDA v1.2 [5]. Dodatkowo obliczono następujące parametry biostatystyczne: obserwowaną i oczekiwaną heterozygotyczność ( $H_o$ ,  $H_e$ ) [6], współczynnik informacji o polimorfizmie (PIC) [7], teoretyczną szansę wykluczenia (MEC) [8], oczekiwane prawdopodobieństwo wykluczenia (PE) oraz siłę dyskryminacji u mężczyzn ( $DP_M$ ) i u kobiet ( $DP_F$ ) [9]. Porównanie rozkładów częstości alleli między populacjami przeprowadzono przy użyciu testu kontyngencji test (RxC contingency test; G. Carmody, Ottawa, Canada).

Tabela II. Wyniki analizy sprzężeń dla czterech loci STR chromosomu X w próbce populacyjnej mniejszości białoruskiej zamieszkującej region Podlasia.

Table II. Results of linkage disequilibrium analysis for 4 X-chromosomal STR markers in a population sample of Belarusian minority residing in northeastern Poland.

Para loci / Locus pair	<i>P</i>
DX8378/HPRTB	0,0984
DX8378/DX7423	0,2013
DX8378/DX7132	0,0075
HPRTB/DX7423	0,1538
HPRTB/DX7132	0,2947
DX7423/DX7132	0,0653

*P*: prawdopodobieństwo testu probability

*P*: exact test probability

## WYNIKI

Częstości alleli i parametry biostatystyczne obliczone dla czterech loci STR chromosomu X przedstawiono w tabeli I. We wszystkich analizowanych loci rozkłady częstości genotypów wśród kobiet były zgodne z rozkładami częstości genotypów wyznaczonymi w oparciu o regułę Hardy-Weinberga ( $0,0734 < P < 0,7922$ ). Wykorzystując testy  $\chi^2$  i G-statistic nie stwierdzono różnic w rozkładach alleli między grupą kobiet i grupą mężczyzn (odpowiednio  $0,1350 < P < 0,9030$  i  $0,1410 < P < 0,9030$ ) dlatego częstości w obu grupach dla poszczególnych loci zostały połączone. Nie wykryto mutacji w żadnym z analizowanych loci na podstawie przypadków segregacji alleli analizowanej w 58 parach matka-syn i 52 parach ojciec-córka.

## DYSKUSJA

Wszystkie analizowane markery posiadają allele różniące się o cztery tandemowe powtórzenia nukleotydu i zlokalizowane są odpowiednio w 1, 2, 3 i 4 grupie sprzężeniowej na chromosomie X [10]. Wyniki testu dokładnego użytego w celu analizy naruszenia równowagi sprzężeń nie wykazały zależności między allelami poszczególnych loci poza parą DXS8378/DXS7132 ( $P=0,0075$ ), stąd mogły one być potraktowane jako niezależne od siebie, analogicznie do systemów autosomalnych (tabela II). Oceniany kwadrupleks charakteryzuje się łączną teoretyczną szansą wykluczenia równą 0,9884 i łączną siłą dyskryminacji równą 0,9945 dla Białorusinów i 0,9992 dla Białorusinek. Porównanie rozkładów częstości alleli z wartościami opisanymi dla populacji polskiej [11] wykazało statystycznie istotne różnice ( $P=0,0000$ ;  $\chi^2$  i G-statistic) w locus HPRTB. Ponadto, rzadko reprezentowane (0,25-0,28 %) w populacji polskiej allele 8 i 17 loci DXS8378 i HPRTB były nieobecne w próbce białoruskiej, która z drugiej strony wykazywała allel 8 (0,5 %) w HPRTB. Prezentowane wyniki potwierdzają poprzednie dane wykazujące występowanie zróżnicowania genetycznego wśród grup etnicznych zamieszkujących północno-wschodnią część Polski [12, 13].

## WNIOSKI

1. Zgodność z prawem Hardy-Weinberga pozwala na stosowanie wszystkich analizowanych loci w badaniach pokrewieństwa oraz identyfikacji.
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. Sadowski A.: Pogranicze polsko-białoruskie. Tożsamość mieszkańców, Białystok 1995.
2. Wiegand P., Bajanowski T., Brinkmann B.: PCR typing of debris from fingernails. Int J Legal Med. 1993, 106, 81-84.
3. 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.

4. Guo S. W., Thompson E. A.: Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 1992, 48, 361-372.
5. 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>.
6. Nei M., Roychoudhury A. K.: Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*. 1974, 76, 379-390.
7. 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.
8. Kishida T., Tamaki Y.: Japanese population data on X-chromosomal STR locus AR. *Nippon Hoigaku Zasshi*. 1997, 51, 376-379.
9. 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.
10. 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.
11. Pepiński W., Skawrońska M., Niemcunowicz-Janica A., Koc-Żorawska E., Janica J., Sołtyszewski I.: Polymorphism of four X-chromosomal STRs in a Polish population sample. *Forensic Sci Int*. 2005, 151, 93-95.
12. Pepiński W., Niemcunowicz-Janica A., Skawrońska M., Koc-Żorawska E., Janica J., Sołtyszewski I.: Allele distribution of 15 STR loci in a population sample of Byelorussian minority residing in the northeastern Poland. *Forensic Sci Int*. 2004, 139, 265-267.
13. Pepiński W., Niemcunowicz-Janica A., Skawrońska M., Koc-Żorawska E., Janica J., Sołtyszewski I.: Y-chromosome STR haplotypes in a population sample of the Byelorussian minority living in the northeastern Poland. *Forensic Sci Int*. 2004, 140, 117-121.

Adres autorów:  
Zakład Medycyny Sądowej AMB  
ul. Waszyngtona 13  
15-269 Białystok  
E-mail: [pepinski@amb.edu.pl](mailto:pepinski@amb.edu.pl) (W. Pepiński)