

Agata Kodroń, Edyta Rychlicka, Iwona Milewska, Marcin Woźniak, Tomasz Grzybowski

Analiza danych populacyjnych *loci* miniSTR: D10S1248, D14S1434 i D22S1045 w regionie kujawsko-pomorskim

Population data analysis of miniSTR *loci*: D10S1248, D14S1434 and D22S1045 in the Pomerania-Kujawy region of Poland

Z Zakładu Genetyki Molekularnej i Sądowej
Katedry Medycyny Sądowej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu,
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Kierownik Katedry: dr hab. med. T. Grzybowski, prof. UMK

Praca przedstawia częstości alleliczne i parametry statystyczne dla trzech *loci* miniSTR D10S1248, D14S1434 i D22S1045 w populacji regionu kujawsko-pomorskiego. Obserwowany rozkład częstości genotypów wykazał zgodność z regułą Hardy'ego-Weinberga. Obliczone parametry statystyczne potwierdziły, że *loci* D10S1248 i D22S1045 są wysoce informatywnymi markerami, podczas gdy D14S1434 wykazuje umiarkowaną przydatność do badań identyfikacyjnych z zakresu genetyki sądowej.

This paper presents the allele frequencies and forensic parameters of the three miniSTR loci D10S1248, D14S1434 and D22S1045 in the Pomerania-Kujawy region of Poland. Genomic DNA was extracted by a standard phenol-chloroform extraction procedure. The three miniSTR loci D10S1248, D14S1434 and D22S1045 were amplified in a triplex polymerase chain reaction with the primer sets designed by Coble and Butler in a GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). The amplified products were separated and detected by capillary electrophoresis on an ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The genotype frequency distributions showed no deviations from Hardy-Weinberg equilibrium expectations. The values of forensic parameters confirm that D10S1248 and D22S1045 are highly informative genetic markers, whereas D14S1434 is a moderately useful for forensic genetic identification purposes.

Słowa kluczowe:

MiniNCO, dane populacyjne, kujawsko-pomorskie, miniSTR, populacja Polski

Key words:

MiniNCO, population data, Pomerania-Kujawy, miniSTR, Polish population

WSTĘP

Podstawowe cele badań genetycznych prowadzonych dla potrzeb identyfikacji osobniczej to możliwość rozróżnienia materiału biologicznego pochodzącego od poszczególnych osobników oraz określenie pokrewieństwa. Analizy te dokonywane są z użyciem markerów polimorficznych [1]. Wysoce polimorficzne sekwencje typu STR charakteryzują się zmienną liczbą powtórzeń sekwencji z jednostką repetytywną o długości od 2 pz do 6 pz, a produkty amplifikacji mieszczą się w zakresie od 100 pz do 450 pz. Są to markery powszechnie stosowane w badaniach z zakresu genetyki sądowej, ponieważ ich badanie jest skutecznym i szybkim sposobem identyfikacji próbek ludzkiego materiału biologicznego [2]. W praktyce badań śladów biologicznych zdarza się, że badany preparat zawiera wysoce zdegradowany DNA, którego fragmenty nie przekraczają 200 pz długości i który często jest zanieczyszczony inhibitorami łańcuchowej reakcji polimerazy. Zastosowanie stan-

dardowych markerów STR skutkuje w takich przypadkach niekompletnym wynikiem lub całkowitym brakiem profilu genetycznego. Poprzez przesunięcie starterów dla markerów STR bliżej sekwencji powtarzalnej długość produktu PCR zostaje zredukowana zachowując tę samą informację – powstaje marker minimikrosatelitarny (miniSTR). Markery miniSTR zapewniają krótsze produkty PCR, mieszczące się w zakresie długości 50 pz -150 pz [3]. Przed zastosowaniem jakiegokolwiek markera do badań wykonywanych dla potrzeb identyfikacji osobniczej i dochodzenia spornego ojcostwa konieczna jest dokładna charakterystyka jego polimorfizmu w badanej populacji.

Celem niniejszej pracy było ustalenie częstości alleli dla trzech *loci* miniSTR (D10S1248, D14S1434 i D22S1045) w próbce 115 niespokrewnionych mieszkańców regionu kujawsko-pomorskiego, ocena parametrów statystycznych badanych układów oraz ocena przydatności tych układów w sprawach z zakresu genetyki sądowej.

MATERIAŁ I METODY

Badana populacja

Materiał badawczy pochodził od 115 niespokrewnionych osób obu płci pochodzących z regionu kujawsko-pomorskiego. Próbki DNA pochodziły ze zanonimizowanej bazy próbek uzyskanych od osób badanych pod kątem spornego ojcostwa i zawierały profile genetyczne matek, dzieci i domniemanych ojców. Do badań wykorzystano próbki pochodzące od osób oznaczonych w bazie jako dzieci. W przypadku jednej z próbek, w której stwierdzono nietypowy wzór alleliczny, dla celów porównawczych, poddano badaniom również DNA rodziców osoby, od której pochodziła próbka.

Ekstrakcja DNA

Materiał, z którego izolowano DNA stanowiły wymazy z policzków. Genomowy DNA wyizolowano stosując standardową metodę ekstrakcji organicznej. Stężenie DNA określano w oparciu o zestaw Quanti-Blot® Human DNA Quantitation Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

PCR

Trzy *loci* miniSTR D10S1248, D14S1434 i D22S1045 amplifikowano z użyciem znakowa-

nych fluorescencyjnie par starterów zaprojektowanych i opisanych przez Coble i Butlera [3], w objętości 10 μ l, użyto 8ng matrycowego DNA, 1X Colorless GoTaq™ Reaction Buffer (zawierającego 1,5 mM MgCl₂) (Promega, Madison, WI, USA), 500 μ M każdego z nukleotydów, 0,65 μ M, 0,17 μ M i 0,24 μ M starterów odpowiednio dla *loci* D10S1248, D14S1434 i D22S1045 (Applied Biosystems), 2.5 U GoTaq™ DNA Polymerase (Promega). Do znakowania starterów wykorzystano barwniki FAM, VIC i NED, zgodnie z opublikowanymi danymi [3]. Amplifikację prowadzono w termocyklerze GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) w następujących warunkach: wstępna denaturacja 95°C/3min, a następnie 30 cykli amplifikacyjnych składających się z denaturacji 94°C/1min, hybrydyzacji starterów 55°C/1min i wydłużania 72°C/1min. Proces kończono elongacją 60°C przez 45 minut.

Elektroforeza i detekcja produktów PCR

Produkty reakcji PCR rozdzielano metodą elektroforezy kapilarnej z zastosowaniem automatycznego sekwenatora ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) i zestawu filtrów G5. Próbki do elektroforezy przygotowywano mieszając 0,3 μ l produktu PCR z 10,7 μ l formamidu (Hi-Di formamide, Applied Biosystems) oraz ze standardem wielkości GeneScan-500LIZ lub GeneScan-600LIZ (Applied Biosystems). Dane z sekwenatora analizowano z użyciem oprogramowania GeneMapper_ID v3.2 (Applied Biosystems). Allele obecne w badanych próbkach określano poprzez porównanie z próbkami kontrolnymi o znanym genotypie: 9947A i ABI 007 (Applied Biosystems).

Genotyp próbki kontrolnej 9947A w układach D10S1248, D14S1434 i D22S1045 to (wg kolejności układów): 13,15; 11,13; 11,14. Genotyp próbki kontrolnej ABI 007 w układach D10S1248, D14S1434 i D22S1045 to (wg kolejności układów): 12,15; 11,14; 11,16. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że powtarzalność pomiarów długości fragmentów DNA uzyskiwanych w amplifikacji próbek kontrolnych mieściła się dla zastosowanych warunków elektroforezy w przedziale \pm 0.6 pz.

Obliczenia statystyczne

Częstość alleli i następujące parametry statystyczne: siła dyskryminacji (PD), prawdopodobieństwo

przypadkowej zgodności (MP), zawartość informacji polimorficznej (PIC), siła wykluczenia (PE) i teoretyczna średnia szansa ojcostwa (TPI) obliczono przy użyciu arkusza kalkulacyjnego PowerStatsV12 [4]. Z obserwowanych częstości alleli obliczono oczekiwaną częstość genotypów stosując równanie Hardy'ego-Weinberga. Zgodność obserwowanych i oczekiwanych częstości alleli z równaniem Hardy'ego-Weinberga badano testem dokładnym. Parametry testu dokładnego, wartość p , heterozygotyczność obserwowaną (H_{obs}) i heterozygotyczność oczekiwaną (H_{exp}) obliczano z wykorzystaniem programu Arlequin Statistical Analysis Package wersja 3.11 [5].

WYNIKI I DYSKUSJA

Długość alleli obserwowanych w badanych układach z zastosowaniem opisanych warunków amplifikacji mieści się w zakresie od 74 pz do 119 pz. Obserwowany rozkład częstości genotypów w zakresie analizowanych *loci* wykazuje zgodność z regułą Hardy'ego-Weinberga ($p > 0,05$ w teście dokładnym). Częstości poszczególnych alleli oraz wartości pozostałych parametrów statystycznych charakteryzujących poszczególne układy miniSTR poddane badaniu przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Rozkład częstości alleli trzech loci miniSTR (D10S1248, D14S1434 i D22S1045) w populacji regionu kujawsko-pomorskiego.

Table I. Distribution of allele frequencies and forensic parameters of the three miniSTR loci (D10S1248, D14S1434 and D22S1045) in the Pomerania-Kujawy region of Poland.

Allele	D10S1248	D14S1434	D22S1045
9			0,004
10		0,122	
11		0,039	0,148
12	0,048	0,035	0,048
13	0,209	0,387	0,009
14	0,339	0,400	0,061
15	0,235	0,013	0,370
16	0,130		0,270
17	0,035	0,004	0,065
18	0,004		0,022
19			0,004
N	115	115	115
H_{obs}	0,765	0,670	0,774
H_{exp}	0,769	0,675	0,761
PD	0,903	0,834	0,893
MP	0,097	0,166	0,107
PIC	0,729	0,614	0,724
PE	0,536	0,383	0,552
TPI	2,130	1,513	2,212
p	0,531	0,782	0,530

N: wielkość próby

H_{obs}: heterozygotyczność obserwowana

H_{exp}: heterozygotyczność oczekiwana

PD: siła dyskryminacji

MP: prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności

PIC: zawartość informacji polimorficznej

PE: siła wykluczenia

TPI: teoretyczna średnia szansa ojcostwa

p: wartość p dla testu dokładnego

N: sample size

H_{obs}: observed heterozygosity

H_{exp}: expected heterozygosity

PD: power of discrimination;

MP: matching probability

PIC: polymorphism information content

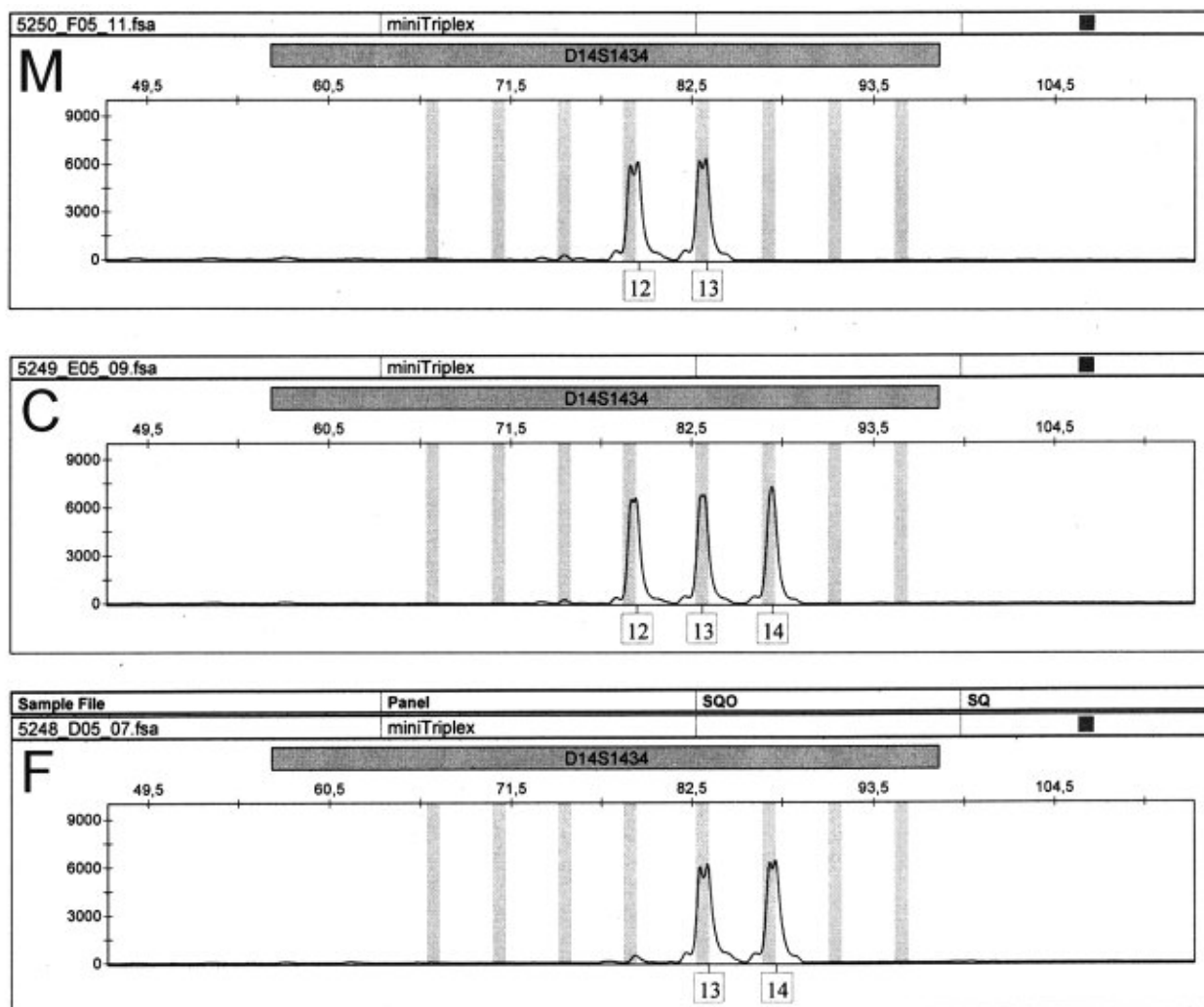
PE: power of exclusion

TPI: typical paternity index

p: p -values for Hardy–Weinberg equilibrium exact test

W trakcie analizy danych populacyjnych w badanym zestawie próbek ujawniono obecność nietypowego, rzadkiego wzoru trójallelicznego. Analizę powtórzono na dwóch niezależnych próbkach DNA w celu wykluczenia obecności ewentualnych artektów reakcji PCR lub zanieczyszczeń. Dysponowano również materiałem genetycznym rodziców

osoby, u której wystąpiła opisywana anomalia. W opisywanym przypadku genotyp dziecka w locus D14S1434 składał się z alleli 12, 13 i 14, podczas gdy ojciec i matka dziecka posiadali normalny, heterozygotyczny wzór układu alleli w tym locus (odpowiednio 13/14 i 12/13 – rycina 1).



Ryc. 1. Elektroforegramy dla locus miniSTR D14S1434 otrzymane podczas analizy testu ojcostwa. Elektroforegramy pokazują dwa allele w profilu matki (M) i ojca (F), podczas gdy u dziecka (C) występuje wzór trójalleliczny zawierający wszystkie allele obecne u rodziców.

Fig. 1. Electrophoregrams of the miniSTR D14S1434 locus obtained in a paternity testing case. Electrophoregrams show two alleles in the maternal profile (M) and in the paternal profile (F), while a three-allelic pattern containing all the parental alleles is present in the child's profile (C).

Wzór trójalleliczny jest w przypadku układów STR zjawiskiem stosunkowo rzadkim. Clayton i współpracownicy sklasyfikowali dwa typy wzorów trójallelicznych [6]. Typ I, w którym piki reprezentujące poszczególne allele charakteryzują się zróżnicowaną wysokością, spowodowany jest mutacją somatyczną w locus heterozygotycznym w wyniku, której powstaje organizm mozaikowy, posiadający w różnych komórkach ciała różną ilość powtórzeń allelu danego *locus* znajdującego się na jednym z chromosomów danej pary. Typ II wzoru trójallelicznego charakteryzuje się wyrównaną wysokością pików reprezentujących poszczególne allele. Przypuszcza się, że taki obraz spowodowany jest lokalną duplikacją fragmentu jednego z chromosomów danej pary w locus heterozygotycznym połączoną z dodaniem lub ubytkiem jednego lub większej ilości powtórzeń w układzie mikrosatelitarnym. Mutacja taka musiałaby zachodzić w jednej z gamet tworzących zarodek lub na bardzo wczesnym etapie rozwoju zarodkowego [6]. Obraz obserwowany w opisywanym przypadku dla *locus* D14S1434 klasyfikuje go do typu 2 wzorów trójallelicznych. Nie można również wykluczyć, że obserwowany wzór trójalleliczny jest wynikiem występowania u badanej osoby trisomii chromosomu 14 z jednoczesną mutacją w obrębie *locus* D14S1434 na zduplikowanym chromosomie. Ze względu na anonimowy charakter bazy, z której pozyskano analizowane próbki, nie było możliwe uzyskanie informacji czy osoba, u której stwierdzono obserwowaną anomalię wykazywała cechy

fenotypowe wskazujące na obecność trisomii chromosomu 14.

Otrzymane dla analizowanych układów parametry statystyczne wskazują, że układy D10S1248 i D22S1045 można uznać za markery wysoce informatywne w populacji Pomorza i Kujaw, podczas gdy układ D14S1434 wykazuje umiarkowaną przydatność do badań identyfikacyjnych i w dochodzeniu spornego ojcostwa w tej populacji. Uzyskane częstości alleli i parametry statystyczne są zasadniczo zgodne z parametrami analizowanych układów STR uzyskanymi przez Reichert i Pawłowskiego dla populacji polskiej [7]. Wszystkie analizowane *loci* wykazują jednak potencjalnie wysoką przydatność w przypadkach, gdy badany materiał genetyczny, ze względu na swą degradację, nie pozwala na uzyskanie ampliconów dłuższych niż 200 pz. Badane układy miniSTR mogą stanowić cenne uzupełnienie analizy z zastosowaniem markerów STR standardowej długości. Należy jednak zauważyć, że wykorzystywana dla celów niniejszej pracy reakcja multipleksowa, której parametry wyjściowe zaczerpnięto z literatury [3] i zoptymalizowano dla potrzeb analizy próbek populacyjnych, zawierających stosunkowo duże ilości DNA, nie dawała zadowalających rezultatów amplifikacji przy stężeniu DNA niższym niż 5 ng na reakcję. Aby mogła ona zostać skutecznie wdrożona do praktycznej analizy śladów biologicznych, szczególnie tych zawierających niewielkie ilości DNA, konieczne byłoby przeprowadzenie odpowiednich procedur optymalizacyjnych.

PIŚMIENNICTWO

1. Szczerkowska Z., Pawłowski R.: Podstawy genetyki sądowej. Wydawnictwo Akademii Medycznej w Gdańsku, Gdańsk, 2002.
2. Krzyżosiak W.: Genom człowieka, największe wyzwanie współczesnej biologii molekularnej i medycyny. PWN, Warszawa, 1997.
3. Coble M.D., Butler J.M.: Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA, J. Forensic Sci. 2005, 50 (1), 43–53.
4. Tereba A.: Tools for Analysis of Population Statistics, Profiles in DNA, 1999, 14-16.
5. Excoffier L., Laval G., Schneider S.: Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 2005, 1, 47-50.
6. Clayton T. M.: A genetics basis for anomalous band patterns encountered during DNA STR profiling, J. Forensic Sci. 2004, 49 (6), 1207-1214.
7. Reichert M., Pawłowski R.: Legal Medicine. 2009, 11, 147-148.

Adres do korespondencji:
dr n. med. Marcin Woźniak
tel. +48 52 585 3552
faks +48 52 585 3553
e-mail: marcinw@cm.umk.pl