

JOANNA WYSOCKA, EWA KAPIŃSKA, KRZYSZTOF RĘBAŁA,
ZOFIA SZCZERKOWSKA, LIDIA CYBULSKA

**GENETYKA POPULACYJNA LOCUS D19S433
W REGIONIE POLSKI PÓŁNOCNEJ**

**POPULATION GENETICS OF THE D19S433 LOCUS
IN THE NORTHERN POLAND**

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Gdańsku
kierownik: prof. dr Zofia Szcherkowska

W pracy przedstawiono dane populacyjne dla czteronukleotydowego locus typu STR – D19S433. Próbkę DNA pochodzące od 255 niespokrewnionych osób z regionu Polski północnej poddano amplifikacji metodą reakcji PCR, a następnie produkty identyfikowano z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej na sekwenatorze ABI Prism 310. Rozkład częstości alleli badanego układu był zgodny z prawem Hardy’ego-Weiberga. Obliczone wybrane parametry statystyczne (PD, PIC, PE, pM, PI) oraz wartość heterozygotyczności wykazały wysoką przydatność locus D19S433 w genetyce sądowej. W czasie badań w sprawie o ustalenie spornego ojcostwa w omawianym locus ujawniono dodatkowy, rzadki allel o wielkości 139 pz.

Wysokie polimorficzne loci typu STR ludzkiego DNA stanowią obecnie podstawowe narzędzie badawcze wykorzystywane w genetyce sądowej. Charakteryzują się one zmienną liczbą krótkich, tandemowych powtórzeń, z jednostką repetytywną wielkości 2–6 pz. Do takich systemów należy mikrosatelitarny układ D19S433. Jego czteronukleotydowe powtórzenia (AAGG) zlokalizowane są na 19 chromosomie. Wzorzec alleli dla locus D19S433 składa się z 15 fragmentów DNA o długości od 102–135 pz.

W pracy przedstawiono wyniki badań populacyjnych systemu D19S433 oraz oceniano jego przydatność w dochodzeniu ojcostwa.

Ponadto w trakcie prowadzonych badań, stosując komercyjny zestaw do reakcji multiplex firmy Applied Biosystem AmpF/STR®Identifiler™ w omawianym locus ujawniono dodatkowy, rzadki allel o wielkości 139 pz [1]. W celu dokładnego zidentyfikowania wariantu fragmenty DNA zawierające nieznaną allel poddano procedurze przygotowującej go do sekwencjonowania.

MATERIAŁ I METODY

Badaniom poddano DNA wyizolowany z próbek krwi obwodowej pobranych od 255 niespokrewnionych osób z terenu Polski północnej. Ekstrakcję DNA prowadzono metodą nieorganiczną, a następnie oznaczano jego stężenie stosując pomiar fluorymetryczny [6].

Amplifikację loci zawartych w zestawie AmpF/STR®Identifiler™ prowadzono w warunkach opisanych przez producenta, w termocyclerze Mastercycler Gradient f-my Zeiss.

Produkty reakcji PCR rozdzielano metodą elektroforezy kapilarnej w sekwenatorze ABI Prism 310. Jako standardu wewnętrznego wielkości DNA używano GS500, znakowanego LIZ (f-my Applied Biosystems).

Allel 18.2 locus D19S433 poddano amplifikacji przy użyciu termocyclera 9700 f-my Applied Biosystems, stosując startery f-my Integrated DNA Technologies INT o następujących sekwencjach: 1: 5'-CCT GGG CAA CAG AAT AAG AT- 3', 2: 5'-TAG GTT TTT AAG GAA CAG GTG G-3'. Reakcję sekwencjonowania prowadzono przy użyciu zestawu ABI Prism Big Dye™ Terminator Cycle sequencing v. 1.1 Ready Reaction Kit (f-my Applied Biosystems) w obu kierunkach w obecności 3,2 pmola nieznakowanego fluorescencyjnie startera w łącznej objętości 10 µl w następujących warunkach: wstępna denaturacja w temp. 96 °C (11 s) oraz 25 cykli: 96 °C (10 s), 50 °C (5 s), 60 °C (4 min). Produkty sekwencjonowania oczyszczano poprzez precipitację etanolem w obecności octanu sodu, wirowano, przemywano 70% etanolem i suszono w temp. 90 °C (1 min), a następnie zawieszano w 10 µl formamidu [2].

Analizy statystycznej dokonano przy użyciu programów komputerowych Utility Programs for Analysis of Genetic Linkage HWE Version 1.10 i Exact test stosując Arlequin. Obliczono częstość alleli, a także współczynniki oceniające przydatność systemu D19S433 w genetyce sądowej: siłę dyskryminacji (PD), wskaźnik informacji o polimorfizmie (PIC), siłę wykluczenia (PE), prawdopodobieństwo zgodności (pM) oraz indeks ojcostwa (PI).

WYNIKI I DYSKUSJA

Tabela I przedstawia obserwowane częstości alleli układu D19S433 w populacji Polski północnej oraz wartości parametrów przydatności w genetyce sądowej. W analizowanej populacji spośród 15 alleli występujących w komercyjnej drabinie zestawu

Identifiler zaobserwowano 12 alleli. Jednocześnie zidentyfikowano rzadki allel locus D19S433*18.2, którego obecność potwierdzono sekwencjonowaniem. Otrzymaną sekwencję allela locus D19S433 porównano z sekwencją w Gene Bank (G08036, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, program komputerowy ClustalX v.1.81) [7]. Przeprowadzona analiza nieznanego allela locus D19S433 wykazała obecność jednostki repetytywnej: (AAGG)₁ AA (AAGG)₁ TAGG (AAGG)₁₇ (ryc. 1).

W badanej sekwencji zaobserwowano delecję dwóch nukleotydów AG występującą pomiędzy pierwszym a drugim motywem repetytywnym (AAGG). Dodatkowo w regionie flankującym (ang. 3'-*flanking region*) badanej sekwencji locus D19S433 w pozycji 124 wykazano obecność adeniny (A), podczas gdy w sekwencji wzorcowej G08036 występuje tymina (T). Identyčzną różnicę zaobserwowali autorzy publikacji badający allel 12.1 locus D19S433 [9]. Zgodnie z nomenklaturą Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej (ISFG) nowo odkryty allel to D19S433*18.2.

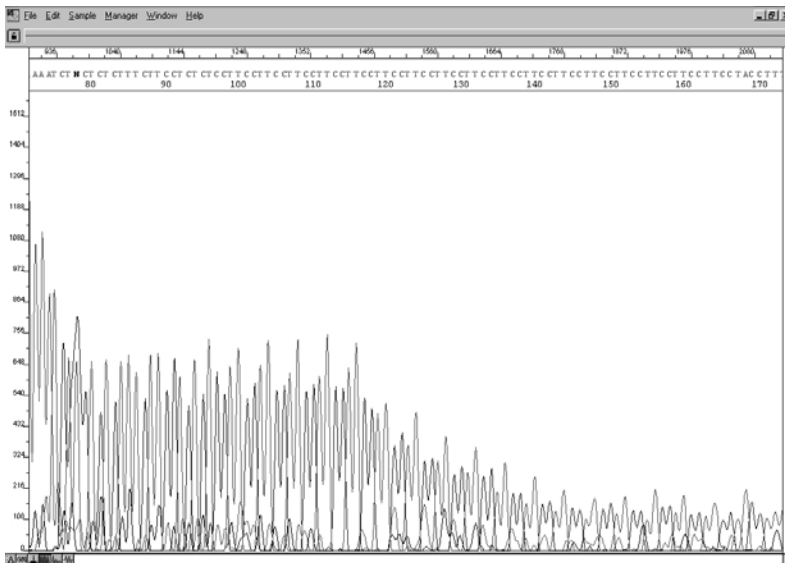
Tab. I

Częstości alleli i współczynniki statystyczne (PD – siła dyskryminacji, PIC – zawartość informacji genetycznej, PE – siła wykluczenia, pM – prawdopodobieństwo zgodności, PI – indeks ojcostwa charakteryzujący locus D19S433 w populacji Polski północnej (n = 255)

Allele frequencies and some indices (PD – power of discrimination, PIC – polymorphic information content, PE – power of exclusion, pM – matching probability, PI – paternity index for locus D19S433 in northern population (n = 255))

Allel	Locus D19S433
11	0,002
12	0,075
13	0,200
13.2	0,014
14	0,392
14.2	0,027
15	0,182
15.2	0,029
16	0,045
16.2	0,022
17	0,010
18.2	0,002

$H_{obs}/H_{ocz.}$	76,5/76,6
PD	0,914
PIC	0,73
PE	0,535
pM	0,086
PI	2,13
χ^2 test	0,699
Exact test	0,750



Ryc. 1. Elektroforegram przedstawiający sekwencję repetytywną nieznanego allela locus D19S433

Fig. 1. Sequencing electropherogram of allele 18.2 at locus D19S433 showing pattern of repeated sequence motif

W wyniku zastosowania testu χ^2 i exact testu stwierdzono, że badane locus znajduje się w stanie równowagi opisanej prawem Hardy'ego-Weinberga (tab. I).

Tabela II przedstawia porównanie częstości alleli locus D19S433 różnych populacji: tureckiej, belgijskiej, rumuńskiej oraz populacji Polski północno-wschodniej.

Tab. II

Częstości alleli locus D19S433 w różnych populacjach

The frequency of D19S433 alleles in selected populations

Locus D19S433 Allele / Alleles	Turcja wsch./zach. [4] (n = 107) Turkey (east/west)	Belgia [5] (n = 222) Belgium	Rumunia [3] (n = 104) Romania	Polska pn.-wsch. [8] (n=320) Poland (northeastern)
10.2	0,005 / 0,005	–	–	–
11	0,009 / –	–	0,014	0,005
12	0,075 / 0,144	0,092	0,115	0,072
13	0,257 / 0,199	0,225	0,197	0,226
13.2	0,023 / 0,009	0,009	0,019	0,008
14	0,304 / 0,292	0,360	0,317	0,359
14.2	0,023 / 0,037	0,009	0,029	0,019
15	0,126 / 0,116	0,178	0,120	0,189
15.2	0,070 / 0,065	0,036	0,058	0,045
16	0,056 / 0,069	0,068	0,063	0,029
16.2	0,033 / 0,028	0,014	0,053	0,027
17	0,014 / 0,023	0,005	–	0,003
17.2	0,005 / 0,014	0,005	0,005	–
18	–	–	0,005	0,003
18.2	–	–	0,005	0,008
19.2	–	–	–	0,005

Powyższe dane wskazują na wysoką zbieżność częstości alleli locus D19S433 obserwowaną w naszej populacji z danymi z innych populacji. Brak istotnych statystycznie różnic między tymi populacjami świadczy o ich homogenności. Rzadki allel 18.2 pojawił się również w populacji Polski pn.-wsch. oraz w Rumunii, autorzy nie przedstawili jednak sekwencji, którą zamieszczono w prezentowanej pracy.

WNIOSKI

1. Częstości alleli locus D19S433 wykazanych w pracy pozostają w równowadze genetycznej Hardy-Weinberga.

2. Parametry statystyczne badanego locus (PD, PIC, PE, pM, PI) wskazują na jego wysoką przydatność w badaniach identyfikacyjnych i w dochodzeniu spornego ojcostwa.
3. Częstości alleli locus D19S433 populacji Polski północnej wskazują na wysoką zbieżność z danymi z innych populacji.
4. Analiza sekwencji nukleotydowej nieznanego allela locus D19S433 wykazała obecność jednostki repetytywnej : (AAGG)1AA(AAGG)1TAGG(AAGG)17. Nowo odkryty allel to D19S433*18.2.

PIŚMIENNICTWO

1. Applied Biosystems (2001): AmpFISTR®Identifiler™ PCR Amplification Kit User's Manual, Foster City, CA, P/N 4322288. – 2. Applied Biosystems (2000): ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits, original and version 2.0, Foster City, Kalifornia, USA. – 3. Barbarii L. E., Rolf B., Constantinescu C., Hohoff C., Calistru P., Dermengiu D.: Allele frequencies of 13 short tandem repeat (STR) loci in the Romanian population. *Forensic Sci. Int.* 2004, 141, 2/3, 171. – 4. Çakır A. H., Şimşek F., Katırcı N., Taşdelen B.: STR data for the AmpFISTR SGM Plus from the eastern and western section of Mediterranean region of Turkey. *Forensic Sci. Int.* 2004, 142, 55. – 5. Decorte R., Engelen M., Larno L., Nelissen K., Gilissen A., Cassiman J. J.: Belgian population data for 15 STR loci (AmpFISTR®SGM Plus and AmpFISTR™ profiler PCR amplification kit). *Forensic Sci. Int.* 2004, 139, 2/3, 211. – 6. Lahiri D., Nurnberger J.: A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991, 19, 5444. – 7. Murray J., 1995, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. – 8. Sołtyszewski I., Pepiński W., Skawrońska M., Koc-Zorawska E., Niemcunowicz-Janica A., Janica J.: STR data for the AmpFISTR SGM Plus loci from Warmia and Mazury (NE Poland). *Forensic Sci. Int.* 2004, 141, 1, 69. – 9. Turchi C., Pesaresi M., Alessandrini F., Onofri V., Arseni A., Tagliabracci A.: Unusual association of three rare alleles and a mismatch in a case of paternity testing. *J. Forensic Sci.* 2004, 49, 2, 260.

J. Wysocka

POPULATION GENETICS OF THE D19S433 LOCUS IN THE NORTHERN POLAND

Summary

This paper presents the allele frequency distribution for the D19S433 locus. DNA samples of 255 individuals from northern Poland were amplified in a multiplex reaction with subsequent automatic detection using capillary electrophoresis (ABI Prism 310 DNA sequencer). In the analyzed population samples locus D19S433 met the Hardy-Weinberg equilibrium conditions. Statistical parameters: PD, PIC, PE, pM, PI and heterozygosity have shown the usefulness of the D19S433 locus in forensic practice.

During population study, there was observed a PCR product which was 4 bp longer than the longest allele in the allelic ladder (139 bp). The presence of the new allele was proved using DNA sequencing analysis.

Adres: dr n. med. Joanna Wysocka
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AMG
ul. Dębowa 23, 80-204 Gdańsk
e-mail: wysocka@amg.gda.pl