

Kornelia Drożdżiak (autor korespondencyjny)

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
kdrozdziok@slam.katowice.pl

Jadwiga Kabiesz

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Marcin Tomsia

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Krzysztof Rębała

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Polimorfizm locus SE33 w populacji Górnego Śląska (Polska południowa)

Streszczenie

Praca przedstawia wyniki badań populacyjnych w obrębie locus ACTBP2 (human beta-actinrelatedpseudogene (SE33) w populacji Górnego Śląska. Locus SE33 jest najbardziej polimorficznym ze wszystkich markerów stosowanych dotychczas w genetyce sądowej, zarówno w badaniach dotyczących ustalania sporności ojcostwa, pokrewieństwa, jak i w identyfikacji śladów biologicznych. Badania przeprowadzono w grupie 1315 osobników dorosłych, niespokrewnionych, płci męskiej i żeńskiej.

Cele niniejszej pracy to: określenie częstości występowania poszczególnych alleli locus SE33 w badanej populacji, ocena zgodności rozkładu alleli z prawem Hardy'ego-Weinberga, obliczenie parametrów oceniających przydatność markera w medycynie sądowej, zbadanie homogenności rozkładu alleli SE33 pomiędzy badaną populacją a populacjami z innych obszarów Polski.

Słowa kluczowe locus ACTBP2, populacja Górnego Śląska, genetyka sądowa

Wstęp

Locus SE33 (ACTP-2- humanactin beta-actin-relatedpseudogene H-beta-Ac-psi-2) zlokalizowany jest na 6. chromosomie człowieka w obrębie długiego ramienia (6q14) (GeneBank Accession:V00481). SE33 jest uznawany za najbardziej zmienne locus ze wszystkich stosowanych dotychczas markerów STR w genetyce sądowej [1]. Locus SE33 wykazuje szczególnie złożony polimorfizm [2, 3] wynikający ze skomplikowanej budowy w obrębie centralnej sekwencji repetytywnej składającej się z czteronukleotydowych powtórzeń AAAG [4, 5]. Bardzo wysoka siła dyskryminacji tego locus spowodowała, że znalazł on swoje miejsce wśród 8 innych loci Niemieckiej Bazy DNA [6]. Brak włączenia omawianego locus do Europejskiego Standardowego Zestawu Loci (ESS) [7] może być konsekwencją wysokiej masy cząsteczkowej skutkującej możliwością degradacji. SE33 występuje w różnych zestawach komercyjnych, a w poszczególnych z nich użyto różnych rodzajów starterów do powielania locus, jak również zastosowano różną wielkość ampliconów mieszczącą się w zakresie od 197 do 381 pz dla zestawu AmpFLSTRSEfiler i od 295 pz do 440 pz dla AmpFLSTR NGM Select PCR Amplification Kit i odpowiednio dla zestawu Power Plex ESX17 Promega od 258 pz do 442 pz oraz zestawu Power Plex

ESI17 Promega od 300 pz do 484 pz. Zaletą locus jest obecność bardzo licznych alleli w drabnie i niewielka tendencja do powstawania stutterów. Wadą markera jest obecność długich ampliconów, które powodują analityczne trudności w pracy ze zdegradowanym DNA [8].

Cele pracy to: analiza polimorfizmu locus SE33 w populacji Górnego Śląska liczącej 1315 osób, określenie częstości występowania poszczególnych alleli, ocena zgodności rozkładu alleli z prawem Hardy'ego-Weinberga, obliczenie parametrów oceniających przydatność w genetyce sądowej i porównanie jej z innymi populacjami Polski.

Materiał i metodyka

Materiał do badań stanowiły krew lub wymazy nabłonków jamy ustnej pobrane od 1315 osobników płci żeńskiej i męskiej zamieszkujących obszar Górnego Śląska w Polsce południowej. DNA izolowano zestawem do izolacji DNA – Blood Mini oraz Sherlock AX firmy A&A Biotechnology lub zestawem EZ1 Tissue DNA Kit [9] w BIOROBOCIE EZ1 firmy QIAGEN [10]. Stężenie DNA określano metodą spektrofotometryczną w aparacie NanoDrop ND-1000 Spectrofotometr firmy Thermo Fisher Scientific TK

Biotech. Reakcję PCR prowadzono w termocyklerze GeneAmp PCR System 2700 i 9700 firmy Applied Biosystems zgodnie z rekomendacją producenta zestawu do typowania próbek AmpFISTR® SefilerPlus™ PCR Amplification Applied Biosystems [11] i zestawem Power Plex ESX17 firmy Promega [12]. Produkty amplifikacji rozdzielano techniką elektroforezy kapilarnej przy użyciu automatycznego analizatora genetycznego 3130 ABI Prism (Applied Biosystems) w stosunku do standardu wewnętrznego wielkości DNA GeneScan-500LIZ™ dla zestawu Sefiler i markera CC5 ILS500 firmy Promega dla zestawu ESX17. Genotypy określano w odniesieniu do drabin allelicznych i definiowano zgodnie z międzynarodowym nazewnictwem przy użyciu programu komputerowego GeneMapper ID v.3.2 software. Drabina alleli dla zestawu AmpFISTR® SefilerPlus™ PCR Amplification Applied Biosystems zawiera 35 alleli, natomiast w zestawie Power PlexESX17Promega 37 alleli (łącznie 39 alleli).

Obliczenia statystyczne

Opracowanie wyników stanowiło wyliczenie obserwowanych i oczekiwanych liczebności i częstości genotypów oraz częstości alleli przy zastosowaniu równania Hardy'ego-Weinberga. W badaniach statystycznych ocenę zgodności między oczekiwanymi i obserwowanymi genotypami – ocenę równowagi Hardy'ego-Weinberga – obliczono z zastosowaniem testu χ^2 i testu Exact z zastosowaniem programu TFGA [13, 14]. Charakterystykę statystyczną locus wykonano, stosując program FatRec. Wyliczono: siłę dyskryminacji PD, heterozygotyczność obserwowaną H_{obs} , heterozygotyczność oczekiwaną H_{tocs} , prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności profili genetycznych PM, siłę wykluczeniową układu MEC, współczynnik informacji polimorficznej PIC, średnie prawdopodobieństwo wykluczenia MEP.

W celu oceny homogenności częstości alleli SE33 w populacji polskiej przeprowadzono analizę wariacji molekularnej AMOVA przy użyciu programu komputerowego Arlequin 3.1 [15]. Wartości P odpowiadające obliczonym metodą AMOVA odległościom genetycznym F_{ST} oszacowano na podstawie 10100 permutacji alleli. Zlinearyzowane wartości F_{ST} posłużyły do sporządzenia wykresów skalowania wielowymiarowego z użyciem oprogramowania STATISTICA 10 (StatSoft). Populację Górnego Śląska porównano z populacją Polski północnej [16, 17] i Podlasia [18].

Wyniki i dyskusja

Uzyskane wartości częstości alleli dla locus SE33 w badanej populacji Górnego Śląska ($n = 1315$) przedstawiono w tabeli 1. Zamieszczono w niej również wartości częstości poszczególnych alleli anali-

zowanego locus SE33 dla populacji Polski północnej ($n = 1007$, 2012 r.) [16] i ($n = 255$, 2008 r.) [17] i Podlasia ($n = 220$) [18].

Przeprowadzone badania polimorfizmu locus SE33 dla 1315 osobników zamieszkujących obszar Górnego Śląska ujawniły obecność 47 alleli. W populacji Polski północnej [16] obserwowano 46 alleli, w populacji Polski północnej [17] 37 alleli, a na Podlasiu obserwowano 35 alleli. Należy podkreślić za autorami badającymi populację Polski północnej [16], że użycie w badaniach zbyt małych grup badawczych skutkuje obserwowaniem znacznie mniejszej ilości alleli, co ma wpływ na zupełnie inne rozłożenie się wartości częstości alleli.

Najczęściej obserwowanym allelem w populacji Górnego Śląska był allel 28,2 ($f = 0,0867$) i dalej w kolejności 27,2 ($f = 0,0757$), 17 ($f = 0,0696$), 29,2 ($f = 0,0665$) i 19 ($f = 0,0654$). W locus SE33 pojawiły się allele występujące bardzo rzadko – allel 7,3; 8; 16,3; 17,3; 28; 31; 36 i 41, w tych przypadkach wartość f wynosiła 0,0004. W populacji Górnego Śląska pojawili się osobnicy z allelami 7,3 ($f = 0,0004$), 8 ($f = 0,0004$), 9 ($f = 0,0008$), 16,3 ($f = 0,0004$), 35 ($f = 0,0011$), 37 ($f = 0,0011$) i 41 ($f = 0,0004$) nieopisywanymi dotąd w literaturze polskiej. Nie wszystkie ujawnione w badaniach allele były obecne w komercyjnych drabinach alleli firmy Promega i Applied Biosystems. Allele 7,3; 12,2; 13,2; 14,2; 15,2; 16,3; 17,3; 19,2; 23; 28; 31; 32; 33; 34 i 41 (których brak w drabinie zestawu Power Plex ESX17 i AmpFISTR® SefilerPlus™ PCR) oznaczono bez zapisu automatycznego, na podstawie precyzyjnego pomiaru wielkości fragmentów, a zapisy te nie były weryfikowane sekwencjonowaniem. Większość próbek przebadano zestawem Power Plex ESX17, natomiast we wszystkich przypadkach ujawnienia alleli pozadrabinowych i allela 22 (obecny tylko w drabinie Power Plex ESX17) oraz 35,2 (obecny w zestawie AmpFISTR® SefilerPlus™ PCR) analizę weryfikowano ponownie zestawem Sefiler Applied Biosystems dla potwierdzenia trafności uzyskanego wyniku.

Analiza danych oparta na testach χ^2 i Exact wykazała, że badana populacja Górnego Śląska w zakresie locus SE33 znajduje się w równowadze genetycznej zgodnej z prawem Hardy'ego-Weinberga ($\chi^2 = 884,5103$, $df = 1081$, $p = 1$) z uwagi na zgodność między danymi oczekiwanymi i obserwowanymi.

W tabeli 1 przedstawiono również parametry statystyczne locus SE33 wskazujące na niezwykle dużą przydatność w medycynie sądowej. We wszystkich pracach dotyczących locus SE33 podkreśla się, że marker ten jest najbardziej polimorficzny z dotychczas przebadanych loci autosomalnych typu STR. Wysokie wartości PIC = 0,9451 (zawartość informacji polimorficznej), $H_{ob} = 0,9480$ (heterozygotyczność obserwowana), PD = 0,9947 (siła dyskryminacji), PE = 0,8941 (średnie prawdopodobieństwo wykluczenia – siła wykluczenia), MEC = 0,8939 (teoretyczna szansa wykluczenia) oraz niska wartość PM = 0,0053 (prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności – współ-

Tabela 1

Częstości alleli oraz podstawowe parametry statystyczne dla locus SE33 w czterech populacjach z obszaru Polski

Allele	Górny Śląsk		Polska północna		Polska północna		Podlasie	
		1315		1007		255		220
4.2	–	–	–	–	–	–	–	–
6.3	–	–	–	–	–	–	–	–
7.3	0,0004	1	–	–	–	–	–	–
8	0,0004	1	–	–	–	–	–	–
9	0,0008	2	–	–	–	–	–	–
10	–	–	–	–	–	–	–	–
11	–	–	–	–	–	–	0,0023	1
11,2	–	–	–	–	0,0020	1	–	–
12	0,0023	6	0,0036	6	0,0059	3	0,0136	6
12,2	0,0011	3	0,0005	1	–	–	–	–
13	0,0095	25	0,0070	14	0,0098	5	0,0023	1
13,2	0,0008	2	0,0015	3	0,0020	1	0,0023	1
14	0,0475	125	0,0318	64	0,0235	12	0,0273	12
14,2	0,0027	7	0,0070	14	–	–	–	–
15	0,0365	96	0,0422	85	0,0510	26	0,0500	22
15,2	0,0008	2	0,0010	2	–	–	–	–
15,3	–	–	0,0005	1	0,0020	1	–	–
16	0,0487	128	0,0501	101	0,0431	22	0,0477	21
16,2	–	–	0,0010	2	–	–	–	–
16,3	0,0004	1	–	–	–	–	–	–
17	0,0696	183	0,0775	156	0,0529	27	0,0705	31
17,3	0,0004	1	–	–	–	–	0,0023	1
18	0,0646	170	0,0546	110	0,0667	34	0,0432	19
18,3	–	–	–	–	–	–	0,0023	1
19	0,0654	172	0,0650	131	0,0804	41	0,0818	36
19,2	0,0057	15	0,0050	10	0,0059	3	0,0091	4
20	0,0529	139	0,0546	110	0,0588	30	0,0432	19
20,2	0,0057	15	0,0119	24	0,0020	1	0,0091	4
21	0,0205	54	0,0223	45	0,0294	15	0,0341	15
21,1	–	–	–	–	0,0020	1	–	–
21,2	0,0186	49	0,0209	42	0,0137	7	0,0182	8
22	0,0049	13	0,0094	19	0,0039	2	0,0068	3
22,2	0,0338	89	0,0283	57	0,0275	14	0,0341	15
23	0,0019	5	0,0015	3	0,0020	1	–	–
23,2	0,0373	98	0,0397	80	0,0412	21	0,0227	10
24	–	–	0,0030	6	–	–	0,0023	1
24,2	0,0395	104	0,0482	97	0,0373	19	0,0341	15
25	–	–	0,0005	1	–	–	–	–
25,2	0,0437	115	0,0407	82	0,0510	26	0,0432	19
26	–	–	0,0015	3	–	–	–	–
26,2	0,0521	137	0,0586	118	0,0608	31	0,0432	19
27	–	–	0,0005	1	–	–	–	–
27,2	0,0757	199	0,0765	154	0,0667	34	0	0
28	0,0004	1	0,0015	3	–	–	0,0841	37

28,2	0,0867	228	0,0755	152	0,0922	47	0,0841	37
29	–	–	0,0015	3	–	–	–	–
29,2	0,0665	175	0,0611	123	0,0745	38	0,0523	23
30	–	–	0,0005	1	–	–	0,0023	1
30,2	0,0487	128	0,0427	86	0,0373	19	0,0636	28
30,3	–	–	0,0005	1	–	–	–	–
31	0,0004	1	0,0015	3	0,0020	1	–	–
31,2	0,0179	47	0,0248	50	0,0196	10	0,0273	12
32	0,0011	3	–	–	0,0020	1	–	–
32,2	0,0137	36	0,0114	23	0,0118	6	0,0227	10
33	0,0027	7	0,0020	4	–	–	0,0091	4
33,2	0,0068	18	0,0045	9	0,0118	6	0,0045	2
34	0,0027	7	0,0035	7	0,0020	1	0,0023	1
34,2	0,0027	7	0,0015	3	0,0020	1	–	–
35	0,0011	3	–	–	–	–	–	–
35,2	0,0027	7	0,0020	4	0,0020	1	–	–
36	0,0004	1	–	–	0,0020	1	0,0023	1
37	0,0011	3	–	–	–	–	–	–
39	–	–	–	–	–	–	–	–
41	0,0004	1	–	–	–	–	–	–
42	–	–	–	–	–	–	–	–
Ht								
	0,9480		0,9380		0,9410		0,9490	
PD								
	0,9947		0,9940		0,9910		0,9900	
PM								
	0,0053		0,0060		0,0090		0,0100	
MEC								
	0,8939		–		–		–	
MEP								
	0,8941		–		–		–	
PIC								
	0,9451		0,9500		0,9400		0,9500	

W tabeli wyróżniono podkreśleniem allele, których brak jest w drabinach AmpFISTRSEfiler i Power Plex ESX17

czynnik zgodności) potwierdzają przydatność locus SE33 dla celów badania pokrewieństwa i do badań identyfikacyjnych śladów biologicznych, w tym również mieszanin.

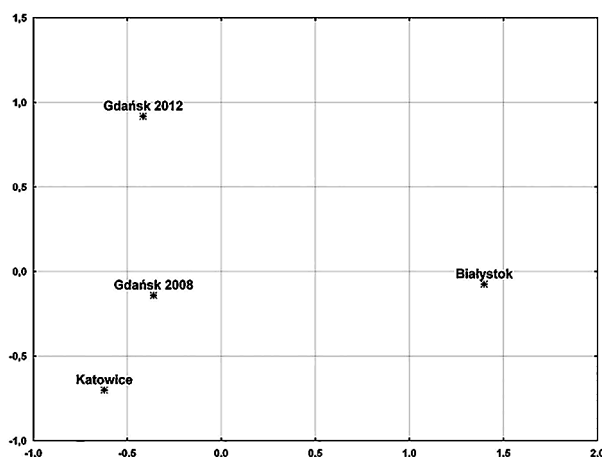
Tabela 2 przedstawia wartości F_{st} i odpowiadające im wartości P ujawnione w analizie AMOVA dla częstości poszczególnych alleli locus SE33 dla czterech populacji [16, 17, 18] i populacji Górnego Śląska. W tabeli 3 przedstawiono wartości F_{st} i P dla analizy homogenności w przypadku porównania populacji

Polski północnej [16, 17] scalonej jako jedna populacja, z populacją Podlasia [18] i Górnego Śląska. Porównanie częstości alleli w zakresie locus SE33 w populacji polskiej, gdzie porównano populację Górnego Śląska z populacją Polski północnej [16, 17] i Polski północnej dla $n = 1262$ nie wykazano znamiennej statystycznie różnic. Natomiast znamienne statystycznie różnice ujawniono porównując populację Górnego Śląska z populacją Podlasia [18] w obu analizach AMOVA.

Tabela 2

Wartości F_{st} (poniżej przekątnej) i odpowiadające im wartości P (powyżej przekątnej) w analizie AMOVA dla częstości alleli SE33. Wytłuszczono wartości $P > 0,05$

	Katowice (N = 1315)	Gdańsk 2008 (N = 255)	Gdańsk 2012 (N = 1007)	Białystok (N = 220)
Katowice	–	0,53965	0,26473	0,00000
Gdańsk 2008	0,00009	–	0,39917	0,00000
Gdańsk 2012	0,00008	0,00005	–	0,00000
Białystok	0,00684	0,00590	0,00662	–



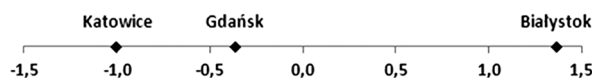
Ryc. 1. Wykres dwuwymiarowy względnych odległości między populacjami uzyskany metodą skalowania wielowymiarowego na podstawie wartości F_{ST} obliczonych metodą AMOVA dla częstości alleli SE33.

Jak już zaobserwowano w pracy analizującej polimorfizm locus SE33 [16] dość zaskakujące jest wykazanie znamiennych statystycznie różnic pomiędzy populacją Polski północnej [16, 17] i Podlasiami [18], co potwierdziły również badania homogenności populacji Górnego Śląska i Podlasia. Słusznie wnioskowano, że generalnie populacja polska wykazuje dużą jednorodność w obrębie większości analizowanych loci autosomalnych typu STR, a wskazanie do używania w obliczeniach statystycznych własnych, lokalnych baz częstości alleli wydaje się jak najbardziej uzasadnione. Należałoby również dodać, że bardzo zaskakującym wydaje się pojawienie się w populacji Podlasia allele 28 jako najczęściej występującego ($f = 0,0841$), podczas gdy w innych badanych populacjach polskich był on allelem występującym rzadko lub w ogóle nieopisywanym.

Tabela 3

Wartości F_{ST} (poniżej przekątnej) i odpowiadające im wartości P (powyżej przekątnej) w analizie AMOVA dla częstości alleli SE33. Wytłuszczono wartości $P > 0,05$

	Katowice (N = 1315)	Gdańsk (N = 1262)	Białystok (N = 220)
Katowice	–	0,33947	0,00000
Gdańsk	0,00004	–	0,00000
Białystok	0,00684	0,00647	–



Ryc. 2. Wykres jednowymiarowy względnych odległości między populacjami uzyskany metodą skalowania wielowymiarowego na podstawie wartości F_{ST} obliczonych metodą AMOVA dla częstości alleli SE33.

Wnioski

Badana populacja Górnego Śląska znajduje się w równowadze genetycznej zgodnej z prawem Hardy'ego–Weinberga.

Parametry statystyczne dla locus SE33 w populacji Górnego Śląska wskazują na bardzo wysoką przydatność markera w badaniach z zakresu genetyki sądowej.

Populacja polska wykazuje cechy homogenności z wyłączeniem populacji Podlasia pod względem występowania alleli dla locus SE33.

Badania populacyjne loci wieloallelicznych wymagają dużej grupy badawczej.

Źródła rycin i tabel

Ryciny 1–2: autorzy

Tabele 1–3: opracowanie własne

Bibliografia

- Lászik A., Sóttonyi P., Rand S., Hohof C.: Frequency data for the STR locus ACTBP2 (SE33) in eight populations, „Int J Legal Med.” 2001, nr 115, s. 94–96.
- Cruz C., Vieira-Silva C., Ribeiro T., Espinheira R.: Genetic data for the locus SE33 in a south Portuguese population with Powerplex® ES System, „International Congress Series” 2006; nr 1288, s. 427–429.
- Möller A., Brinkmann B.: Locus ACTBP2 (SE33) Sequencing data reveal considerable polymorphism, „Int. J. Legal” 1994, nr 106, s. 262–267.
- Wang D.Y., Green R.L., Lagace R.E., Oldroyd N.J., Hennessy L.K., Mulero J.J.: Identification and secondary structure analysis of a region affecting electrophoretic mobility of the STR locus SE33, „Forensic Sci. Int. Genet.” 2012, nr 6 (3), s. 310–316. doi: 10.1016/j.fsigen.2011.06.008.
- Davis C., Ge J., King J., Malik N., Werich V., Eisenberg A.J., Budowle B.: Variants observed for STR locus SE33: A concordance study, „Forensic Sci Int Genet.” 2012, nr 6 (4), s. 494–497, doi: 10.1016/j.fsigen.2011.12.002.
- Martin P.D., Schmitter H., Schneider P.M.: A brief history of the formation of DNA databases in forensic science within Europe, „Forensic Sci. Int.” 2001, nr 119 (2), s. 225–231.
- Gill P., Fereday L., Morling N., Schneider P.M.: The evolution of DNA databases – recommendations for new European STR loci, „Forensic Sci. Int.” 2006, nr 156 (2–3), s. 242–244.
- Ghosh A., Seshadri M.: Forensic assessment of ACTBP2 (SE33) microsatellite, „J. Forensic Sci” 2003, nr 48, s. 1195–1196.
- A&A Biotechnology, 2004, Uniwersalny zestaw do izolacji DNA z krwi.
- Qiagen EZ1 DNA Handbook, 02, 2004.
- Applied Biosystems, AmpFISTR SEfiler™ PCR Amplification Kit User's Manual, Foster City, CA 94404 USA, PN 4335145, 08/2006.
- Technical Manual, Power Plex ESX17 System, Promega Corporation.

13. Brenner C., Morris J.W.: Paternity index calculations in single locus hypervariable DNA probes validation and other studies, Proceedings from International Symposium of Human Identification, Promega Corporation, 1989, s. 21–53.
14. Miller M.: Tools for population Genetic Analyses (TFPGA), 1997, 3, Free program distributed by author over the internet at <http://herb.bio.nau.edu/~mille/tfpga.thtm>.
15. Excoffier L, Laval G, Schneider S: Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis, „EvolBioinform Online” 2005, nr 1, s. 47–50.
16. Wysocka J., Kapińska E., Cybulska L., Rębała K., Szczerkowska Z.: Identyfikacja osobnicza w oparciu o analizę 11 polimorficznych loci DNA typu STR. Badania populacji Polski północnej z wykorzystaniem zestawu AmpFISTRSEfiler Kit, „Ann Acad Med. Gedanensis” 2008, nr 38, s. 91–96.
17. Reichert M., Maciejewska A., Talarczyk K., Paszkowska R., Jakubowska J., Dettlaff-Kąkol A., Maciejewska I., Pawłowski R.: Polimorfizm locus SE33 w populacji polskiej, „Arch. Med. Sądowej Kryminol.” 2012, nr 62, s. 160–164.
18. Janica J., Pepiński W., Skawrońska M., Niemcunowicz-Janica A., Koc-Żórawska E.: Polimorfizm 10 autosomalnych loci STR w populacji Podlasia – rozszerzenie typowego panelu badawczego, „Arch. Med. Sądowej Kryminol.” 2007, nr 57, s. 248–251.