

**Barbara Opolska-Bogusz*, Grzegorz Kaczmarczyk*, Danuta Piniewska*,
Agnieszka Stawowiak*, Marek Sanak****

Wariant alleliczny układu D13S317.6' w badaniu spornego ojcostwa; znaczenie w genotypowaniu półautomatycznym

Allelic variant 6' at locus D13S317 in a paternity casework; a semi-automatic genotyping problem

* Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej CM UJ w Krakowie

p.o. Kierownika: prof. dr hab. M. Kłys

** Z Katedry Chorób Wewnętrznych CM UJ w Krakowie

Kierownik: prof. dr hab. A. Szczeklik

Podczas rutynowego badania spornego ojcostwa, przy użyciu zestawu autosomalnych loci typu STR – AmpFISTR Identifiler, stwierdzono brak segregacji znanych alleli matczynego locus D13S317, wynikający z przekazania dziecku przez matkę krótszego, nie rozpoznanego wariantu allelicznego. W zakresie 13 spośród 15 zbadanych loci dziecko dziedziczyło allele od pozwanego, jednakże w zakresie układu CSF1PO wystąpiła mutacja. Z tego względu sprawdzono sekwencję wariantu allelicznego D13S317 u matki i dziecka postępując się techniką bezpośredniego sekwencjonowania. Wariant alleliczny zawierał 6 typowych powtórzeń motywu TATC oraz dodatkowe powtórzenie AATC. Przez analogie do opublikowanej sekwencji wariantów allelicznych nazwano go D13S317.6'. Ten wariant alleliczny wydaje się rzadki w polskiej populacji, jednakże ze względu na jego ruchliwość elektroforetyczną, między poprzedzającym układem TH01 a D13S317, dokładna analiza zapisu elektroforetycznego po procedurze automatycznego genotypowania wydaje się niezbędna dla uniknięcia omyłkowej interpretacji wyników.

During a routine paternity casework, performed with automated genotyping using AmpFISTR Identifiler kit, an inconsistency affecting maternal segregation of D13S317 allele was encountered, manually detected as a variant allele in the mother and child. Alleles of the putative father were transmitted in 13 out of 15 autosomal STR loci but in CSF1PO locus there was an apparent mutation. We therefore directly sequenced the variant D13S317 allele in mother and the child and compared results to the

available data on variant alleles within this STR locus. The variant allele consisted of 6 TATC repeats and an additional AATC motif, thus by a similarity to the previously reported variant it was labeled D13S317.6'. It seems that the variant allele is quite rare in the Polish population, however, its electrophoretic mobility between preceding TH01 alleles and that of D13S317 one, requires a careful scrutiny of automated genotyping traces to avoid misinterpretation of the results.

Słowa kluczowe: wariant D13S317.6'
Key words: genetic variation D13S317.6'

Wykonywane w Pracowni Hemogenetyki Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej w Krakowie badania spornego ojcostwa obejmują m.in. ustalenie profilu genetycznego badanych osób przy użyciu popularnego multipleksowego systemu układów STR – AmpFISTR Identifiler. W przedstawianym przypadku, podczas automatycznej analizy profili genetycznych pozwanego oraz matki i dziecka stwierdzono w zakresie układu D13S317 u dziecka brak allele przekazanego od matki. Dodatkowo obserwowano brak segregacji allele ojcowskiego w układzie CSF1PO. Segregacja alleli matczynych i pochodzących od pozwanego w pozostałych 13 autosomalnych układach STR wskazywała na wysokie prawdopodobieństwo biologicznego ojcostwa pozwanego w stosunku do dziecka.

Szczegółowa analiza wyników rozdziału elektroforetycznego ujawniła, że dziecko odziedziczyło od matki wariant alleliczny D13S317.6'. Natomiast w układzie CSF1PO stwierdzono mutację allele, przypuszczalnie ojcowskiego pochodzenia. Pozwoliło to, po uwzględnieniu wyników analizy mikrosatelitarnych układów MS8/*Hinfl* i MS43a/*Hinfl* na ustalenie 99,99999% prawdopodobieństwa ojcostwa pozwanego w badanym przypadku spornego ojcostwa.

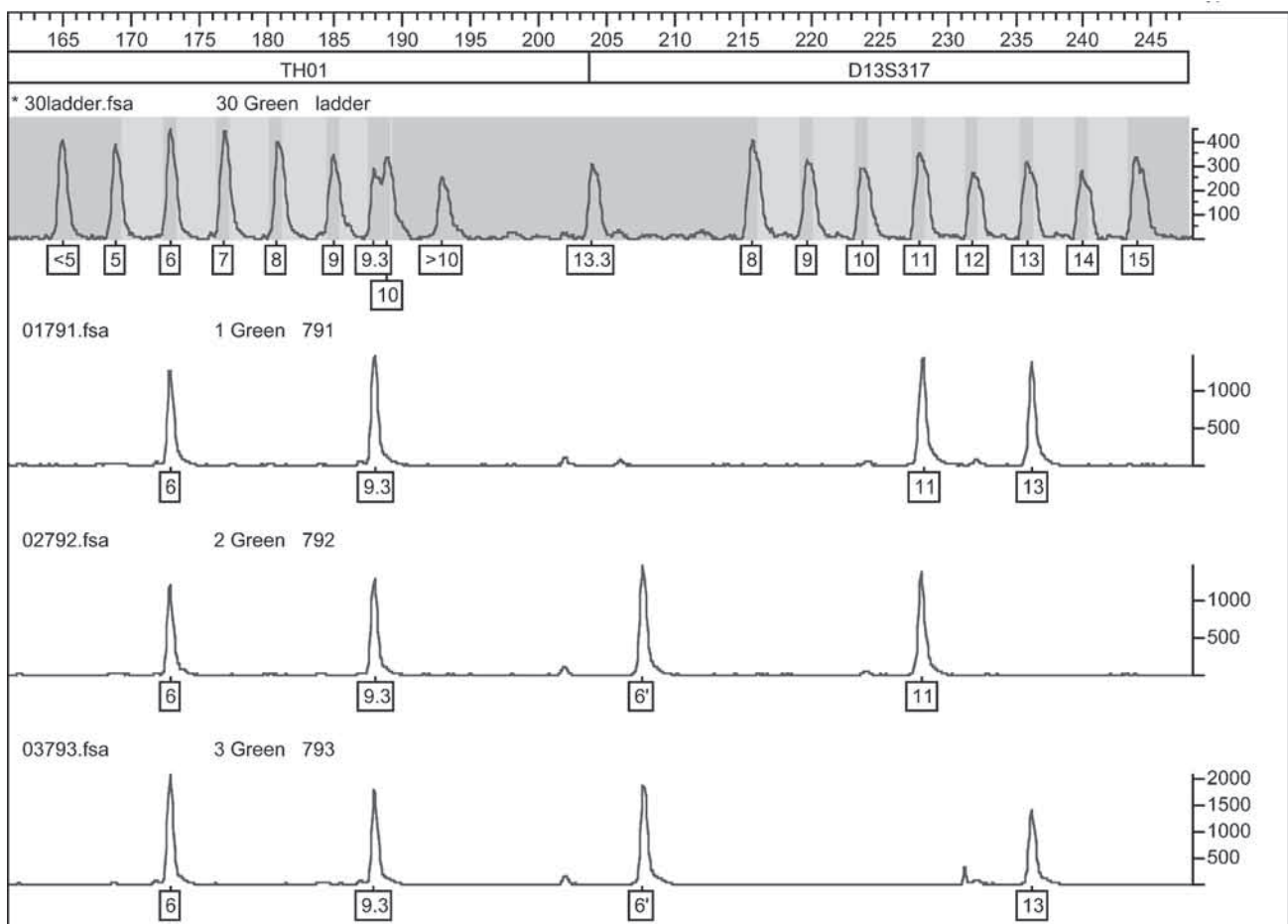
WPROWADZENIE

Polimorficzny układ powtórzeń tetranukleotydo- wych D13S317 znajduje się na chromosomie 13 (13q22-q31). Powtórzenia motywu nukleotydowego TATC typowo występują w 5 do 16 kopii, co w przypadku starterów reakcji PCR używanych

w zestawach firmy Applied Biosystems daje produkt amplifikacji o długości od 204 do 248 nukleotydów [1]. Stwierdzony podczas genotypowania DNA matki i dziecka wariant alleliczny był mniejszy od najmniejszego w zestawie wzorców D13S317.8 o 8,06 nukleotydu, natomiast był większy od nieobecnego w populacji polskiej allele TH01.13.3 za- ledwie o 3,73 nukleotydu (ryc. 1). Układy TH01 i D13S317 w multipleksie są znakowane tym samym barwnikiem fluorescencyjnym. Było to przyczyną braku prawidłowego rozpoznania wariantu allelicznego D13S317 przez program Genotyper (Applied Biosystems, wersja 3.7NT) i pozornego braku segregacji allele matczynego podczas automatycznego rozpoznawania alleli. W badanym materiale wariant alleliczny D13S317 wystąpił u matki w heterozygotycznym genotypie, wraz z allele 13 i został przekazany dziecku, które od pozwanego odziedziczy-

Ryc. 1. Zapis elektroforegramu dla układów AMPFISTR Identifiler TH01 i D13S317. Próbki 791, 792 i 793 odpowiadają pozwanemu, dziecku i matce w badaniu o sporne ojcostwo. W pierwszej linii wzorzec alleliczny w zakresie wymienionych układów. Skala wykresu podana w nukleotydach.

Fig. 1. Electrophoregram trace of AMPFISTR Identifiler kit including TH01 and D13S317 loci. Samples 791, 792 and 793 correspond to the putative father, child and mother respectively, in a paternity casework. Upper lane is the allelic ladder. Scale of figure in nucleotides.



to ponadto allel 11. Ze względu na rzadkie występowanie wariantów allelicznych układu D3S317, a także na dodatkową niezgodność segregacji alleli w układzie CSF1PO, w którym dziecko (11-13) odziedziczyło allel od matki (11-12), lecz nie od pozwanego (11-14), podjęto próbę ustalenia sekwencji zaobserwowanego wariantu allelicznego w układzie D13S317.

MATERIAŁY I METODY

Rozdział fragmentów DNA

Materiałem była krew żylna od pozwanego, matki i dziecka zgłaszających się do badania spornego ojcostwa (próbki 791, 792, 793/2005). Genomowe DNA izolowano rutynową metodą hypotonicznej lizy krwinek czerwonych, trawienia proteinazą K osadu krwinek białych i precypitacji DNA etanolem z roztworu przy obecności jonów sodowych. Amplifikacji poddano 5 ng genomowego DNA, posługując się zestawem odczynników AmpFISTR Identifiler firmy Applied Biosystems zgodnie z zaleceniem producenta. Rozdział produktów amplifikacji przeprowadzono przy użyciu zautomatyzowanego systemu do elektroforezy ABI Prism 377 na 5% poliakrylamidowym żelu denaturującym (Amresco, USA) przy drodze rozdziału 36 cm, w obecności wewnętrznego wzorca długości DNA GeneScan-500

Liz. Wielobarwny obraz żelu został zanalizowany przy użyciu matrycy G5 oprogramowaniem GeneScan Analysis 3.7 NT. Przypisania alleli na podstawie użytego standardu allelicznego dokonano programem Genotyper 3.7 NT w oparciu o plik wsadowy Identifiler CODIS macro wersja 1.

Sekwencjonowanie DNA

Amplifikację 10 ng genomowego DNA przeprowadzono przy użyciu termocyklera ABI2400 stosując startery specyficzne dla układu D13S317 zalecane dla układów CODIS:

D13S317-F 5'-ATT ACA GAA GTC TGG
GAT GTG GAG GA,
D13S317-R 5'-GGC AGC CCA AAA AGA
CAG A.

Reakcję PCR przeprowadzono stosując następujące parametry: denaturacja wstępna 95°C 11 min, następnie 10 cykli: 94°C 30 sek. – 60°C 30 sek. – 70°C 45 sek., następnie 20 cykli: 90°C – 30 sek. – 60°C 30 sek. - 70°C 45 sek. oraz końcowa elongacja 60°C 30 min. Produkty PCR rozdzielono elektroforetycznie w 1% mini-żelu agarozowym (Applied Biosystems). Po ich wizualizacji bromkiem etydyny (0,5µg/ml) mniejszy z produktów amplifikacji, o wielkości około 200 par zasad nukleotydowych wycięto z żelu i oczyszczono przy użyciu zestawu Gel out (AA Biotechnology, Gdańsk). Reakcje sekwencjonowania z użyciem starterów identycznych jak

Tabela I. Porównanie sekwencji referencyjnych markera D13S317 człowieka (AF250876 i G09017) oraz szympansa (AADA012397290) z wariantem allelicznym D13S317 – 6.

AF250876	– gaccatctaacgcctatctgtatttacaatacat
G09017	– gaccatctaacgcctatctgtatttacaatacat
AADA01239720	– gaccatctaacgcctatctgtatttacaatacat
Dziecko #792	– GACCCATCTAACGCCTATCTGTATTTACAAATACAT
AF250876	– tatc tatc tatc tatc tatc tatc tatc tatc tatc
G09017	– tatc tatc tatc tatc tatc tatc tatc tatc tatc
AADA01239720	– tatc tatc tatc tatc tatc tatc tatc tatc tatc
Dziecko #792	– TATC TATC TATC TATC TATC TATC TATC TATC TATC
AF250876	– tatc tatc tatc tatc aatcatctatctatctttctgtc
G09017	– tatc tatc tatc tatc aatcatctatctatctttctgtc
AADA01239720	– tatc tatc tatc tatc aatcatctatctatctttctgtc
Dziecko #792	– AATC AATCATCTATCTATCTTTCTGTC
AF250876	– tgtctttt
G09017	– tgtctttt
AADA01239720	– tgtctgtt
Dziecko #792	– TGTCTTTTT

Powtórzenia motywu TATC zostały zaznaczone czcionką pogrubioną. Różnice pojedynczych nukleotydów sekwencji wyróżniono podkreśleniem.

do PCR wykonano zestawem DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Promega, USA) zgodnie z zaleceniem producenta. Produkty sekwencjonowania rozdzielono metodą elektroforezy na sekwencjonatorze ABI Prism 377. Analizę wyników przeprowadzono przy użyciu programu Sequence Analysis v3.7 (Applied Biosystems)

WYNIKI I OMÓWIENIE

Zanalizowano sekwencję wariantu allelicznego stwierdzonego u matki i u dziecka. Wykazała ona identyczną sekwencję u obu badanych, odpowiadającą 6 powtórzeniom motywu TATC i jednemu powtórzeniu AATC (tab. I). Ten wariant alleliczny został zatem zidentyfikowany jako D13S317-6'. Porównanie referencyjnych sekwencji dla locus D13S317, zawierających 13 powtórzeń nie ujawniło żadnych innych zamian nukleotydowych. Warto wspomnieć, że locus D13S317 wykazuje w analizowanym zakresie dużą konserwatywność, a opisana niedawno [2] jego sekwencja u szympansa różni się zaledwie jednym nukleotydem, poza regionem powtórzeń. Wariant alleliczny D13S317 był już wielokrotnie obserwowany, ze średnią częstością od 1:2230 do 1:32 660 badanych genotypów [3]. W populacji polskiej taki allel został już opisany przez Raczek E. i wsp. [4]. Przedstawiany w pracy wariant sekwencji allela D13S317-6', ze względu na transwersję T>A w ostatnim powtórzeniu przypomina wariant o 10' sekwencji [TATC]₁₀AATC zsekwencjonowany przez Lins A. M. i wsp. [5].

Na około 2500 badań genotypu osób niespokrewnionych, obejmujących układ D13S317 allel 6' był obserwowany w Pracowni Hemogenetyki Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej w Krakowie po raz pierwszy. Jego częstość występowania w północno-wschodniej Polsce oszacowano na ok. 0,001 na podstawie 517 badanych osób w sprawach o ojcostwo [6]. Natomiast w północno-centralnej Polsce, na 824 nie spokrewnione osoby badane

w zakresie 15 układów STR, allel D13S317 nie był obserwowany [7].

PIŚMIENNICTWO

1. http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/str_d13s.htm
2. Birren B. i wsp., Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature* 437 (7055), 69-87 (2005).
3. http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/var_d13s.htm
4. Raczek E.: Rzadkie, pozadrabinowe allele w STRowych loci w populacji Górnego Śląska. *Arch. Med. Sąd. Krym.*, 2004, 2-3, 101-106.
5. Lins, A. M., Micka, K. A., Sprecher, C. J., Taylor, J. A., Bacher, J. W., Rabbach, D., Bever, R. A., Creacy, S., and Schumm, J. W. (1998) Development and population study of an eight-locus short tandem repeat (STR) multiplex system. *J. Forensic Sci.* 43(6):1168-1180.
6. Kozioł P., Ciesielka M., Mądro R., Krajka A.: Genetic data on 19 STR loci in south-east Poland. *Forensic Sci. Int.* 139 (2004) 89-92.
7. Czarny J., Grzybowski T., Derenko M. V., Malyarchuk B. A., 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.* 147 (2005) 97-100.

Adres pierwszego autora:
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Collegium Medicum UJ w Krakowie
ul. Grzegórzecka 16
31-531 Kraków