

# **POLYMORPHISM OF THE STR LOCI: TH01, TPOX AND CSF1PO IN THE POPULATION OF UPPER SILESIA; THEIR USEFULNESS IN DISPUTED PATERNITY TESTING**

Ewa RACZEK, Kornelia DRO DZIOK, Jadwiga KABIESZ

*Chair and Department of Forensic Medicine, Silesian Medical Academy, Katowice*

**ABSTRACT:** Population genetics studies were carried out on samples of unrelated individuals from the Upper Silesian population using STR systems: TH01 ( $n = 240$ ), TPOX and CSF1PO ( $n = 162$ ). No deviations from the H-W equilibrium were observed. No rare alleles and no aberrations from Mendelian laws were found.

The allele frequency at two (TPOX, CSF1PO) of the three STR loci in the Upper Silesian population was similar to those of other Polish and European populations. Allele frequencies of Polish populations which had been compared with each other in the TH01 system were not homogeneous. The following statistical parameters of forensic importance were calculated: observed heterozygosity ( $H_{t_{obs}}$ ), expected heterozygosity ( $H_{t_{exp}}$ ) discrimination power ( $PD$ ), mean exclusion chance ( $MEC$ ), mean exclusion probability ( $MEP$ ) and polymorphic information content ( $PIC$ ).

**KEY WORDS:** Polymorphism; TH01; TPOX; CSF1PO, Upper Silesia.

*Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLV, 2001, 81–92*

*Received 22 January 2001; accepted 11 April 2001*

## INTRODUCTION

Systems: TH01 (11p15.5), TPOX (21p13-2pter) and CSF1PO (5q33.5-q34) are highly polymorphic STR type DNA loci. In all human races, these systems have a well-defined polymorphism level and are useful for DNA analysis carried out in criminalistic and disputed paternity investigations [1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22].

The aim of this work was to determine the genotype frequency of the TH01, TPOX, and CSF1PO loci in the population of Upper Silesia and demonstrate its homogeneity with populations from other regions of Poland.

## MATERIALS AND METHODS

Polymorphism analysis of TH01, TPOX and CSF1PO loci was carried out on a sample of unrelated adults living in the Upper Silesia region. In the present study the TH01 locus was examined in 240 individuals, and the TPOX and CSF1PO loci in 162 individuals.

DNA was extracted using a modified version of the Kunkel method [7] – instead of phenol, a chloroform: isoamyl alcohol (24:1) mixture was used.

The concentration and purity of the extracted DNA was assessed by the spectrophotometric method using Hitachi apparatus and the DNA/protein card 1E programme.

Amplification was carried out using a Perkin Elmer 480 thermocycler (Perkin Elmer). PCR products were separated in a 6% denaturing vertical polyacrylamide gel (Gene Page Plus-Amresco) using SA-32 apparatus (Life Technologies) and silver stained. The amplification, electrophoresis and silver staining was performed according to the protocol supplied with the amplification kit, including single locus TH01 amplification system and triplex CSF1PO, TPOX and TH01 amplification kit, made by Promega corporation.

Statistical calculations were performed using TFPGA (expected and observed heterozygosity  $\chi^2$  and exact tests) and Carmody's (homogeneity test) software, kindly submitted by Mrs P. Wolańska-Nowak, MSc (Institute of Forensic Research in Cracow) and Dr P. Koziół (Faculty of Legal Medicine in Lublin).

## RESULTS AND DISCUSSION

The polymorphism level of analysed systems is presented in Table I. The presence of 6 out of 8 alleles described in the literature [5] and 15 phenotypes were observed at the TH01 locus in the Upper Silesian population. 5 out of 8 [4] and 7 out of 10 [8, 19] alleles described in the literature were found at the TPOX and CSF1PO loci respectively. For the TPOX and CSF1PO loci, 11 and 16 phenotypes respectively were revealed.

In the Upper Silesian population, the most frequently observed allele of the TH01 locus is 9.3 ( $f = 0.3625$ ), and the least frequently – allele 10 ( $f = 0.0021$ ). The most frequent phenotypes, 6-9.3 and 9-9.3, occurred with frequency  $f = 0.1667$ , and thus can be stated to be widespread. Allele 8 ( $f = 0.5556$ ) and 11 ( $f = 0.2562$ ), and phenotypes 8-8 ( $f = 0.3333$ ) and 8-11 (0.2469) dominate at locus TPOX in the studied population. Although the CSF1PO locus is considered much more diverse (10 described alleles), the most frequent alleles are 12 ( $f = 0.3426$ ) and 10 ( $f = 0.3086$ ), whilst the most

commonly observed phenotypes are 10-12 ( $f = 0.2469$ ) and 11-12 (0.1605). Inter-alleles were not observed at any of the analysed loci.

TABLE I. FREQUENCIES OF LOCI: TH01, TPOX AND CSF1PO IN THE POPULATION OF UPPER SILESIA

Allele	TH01 $n = 240$	TPOX $n = 162$	CSF1PO $n = 162$
5	0.0000	–	–
6	0.2125	0.0000	–
7	0.1333	0.0000	0.0000
8	0.0792	0.5556	0.0000
9	0.2104	0.1019	0.0340
9.3	0.3625	–	–
10	0.0021	0.0617	0.3086
11	0.0000	0.2562	0.2469
12	–	0.0247	0.3426
13	–	–	0.0432
14	–	–	0.0216
15	–	–	0.0031
Test $\chi^2_{df}$	$\chi^2_{15} = 13.8750$ $p = 0.5350$	$\chi^2_{10} = 5.7706$ $p = 0.8342$	$\chi^2_{21} = 27.6916$ $p = 0.1491$
Exact test (Markov Chain)	$p = 0.4091 \pm 0.0388$	$p = 0.8426 \pm 0.0194$	$p = 0.0836 \pm 0.0315$
Exact test (Monte Carlo)	$p = 0.5007 \pm 0.0174$	$p = 0.8421 \pm 0.0099$	$p = 0.0642 \pm 0.0090$

Similarly to other reported Polish, European and world populations, the TH01, TPOX and CSF1PO loci in the Upper Silesian region show no deviations from Hardy-Weinberg equilibrium, as shown by the  $\chi^2$  test and the exact test, calculated using the Monte Carlo method and Markov chain (TFPGA software, Table I) [1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22]. A comparison of the allele frequencies of analysed loci in the Upper Silesian population with other regions of Poland is presented in Table II.

The comparison in Table II indicates that for a confidence level  $p = 0.05$ , only the populations of north-east Poland [13, 14], Pomorze-Kujawy [8] and Lower Silesia [3] have a similar distribution of allele frequencies to Upper Silesia. The remaining reported Polish populations show differences in allele frequencies at the TH01 locus. A similar lack of concordance to the Upper Silesian population in terms of allele frequencies of the TH01 system ( $p < 0.05$  in Carmody test) was found for German [6], Slovenian [22] and Spanish [4] population samples. Only the Italian [5] population revealed a similar distribution of allele frequencies at TH01 ( $p = 0.015$ ) to the Upper Silesian region.

Additionally, a lack of concordance in alleles distribution was observed between the population of Upper Silesia and that of, for example, Japan or Zimbabwe ( $p = 0.000$ ) [2, 11].

TABLE II. COMPARISON OF THE ALLELE FREQUENCIES OF LOCI: TH01, TPOX AND CSF1PO IN THE POPULATION OF UPPER SILESIA TO OTHER POLISH POPULATION SAMPLES

Compared populations	TH01			TPOX			CSF1PO		
	$\chi^2$	$p$	Homogeneity	$\chi^2$	$p$	Homogeneity	$\chi^2$	$p$	Homogeneity
Upper Silesia (own research) <i>versus</i> :									
North Poland [12]	12.57	0.020	No	–	–	–	–	–	–
North Poland [17, 18]	14.14	0.015	No	2.07	0.708	Yes	10.13	0.057	Yes
North-east Poland [13, 14]	9.72	0.092	Yes	3.13	0.545	Yes	4.56	0.486	Yes
Pomerania-Kujawy [8]	7.32	0.203	Yes	2.33	0.697	Yes	9.60	0.081	Yes
Lower Silesia [3]	6.56	0.277	Yes	5.32	0.251	Yes	3.17	0.666	Yes
South Poland [19]	23.20	0.000	No	1.76	0.798	Yes	2.90	0.731	Yes
South Poland [21]	17.96	0.000	No	1.49	0.844	Yes	2.35	0.784	Yes
South-east Poland [9]	36.38	0.000	No	9.92	0.056	Yes	14.58	0.010	No

Yes –  $p > 0.05$ ; No –  $p < 0.05$ .

Some Polish regional populations show a lack of homogeneity at the TH01 locus, when compared “each one with each one” and “all-together” (Table III).

TABLE III. HOMOGENEITY OF POLISH POPULATIONS (CARMODY'S TEST)

Compared populations	TH01			TPOX			CSF1PO		
	$\chi^2$	$p$	Homogeneity	$\chi^2$	$p$	Homogeneity	$\chi^2$	$p$	Homogeneity
North Poland [12] <i>versus</i> :									
North Poland [17, 18]	0.44	0.998	Yes	–	–	–	–	–	–
North-east Poland [13, 14]	0.66	0.985	Yes	–	–	–	–	–	–
Pomerania-Kujawy [8]	1.97	0.842	Yes	–	–	–	–	–	–
Lower Silesia [3]	3.48	0.621	Yes	–	–	–	–	–	–
Upper Silesia (own research)	12.57	0.020	No	–	–	–	–	–	–
South Poland [19]	5.03	0.432	Yes	–	–	–	–	–	–
South Poland [21]	3.71	0.595	Yes	–	–	–	–	–	–
South-east Poland [9]	16.32	0.003	No	–	–	–	–	–	–
North Poland [17, 18] <i>versus</i> :									
North-east Poland [13, 14]	1.96	0.841	Yes	2.85	0.563	Yes	2.21	0.838	Yes
Pomerania-Kujawy [8]	3.47	0.620	Yes	0.78	0.941	Yes	6.27	0.287	Yes
Lower Silesia [3]	4.19	0.557	Yes	3.29	0.525	Yes	7.28	0.186	Yes
Upper Silesia (own research)	14.14	0.015	No	2.07	0.708	Yes	10.13	0.057	Yes
South Poland [19]	5.00	0.415	Yes	4.65	0.318	Yes	9.73	0.086	Yes
South Poland [21]	3.64	0.592	Yes	3.64	0.495	Yes	6.94	0.225	Yes
South-east Poland [9]	12.59	0.022	No	6.82	0.168	Yes	7.08	0.216	Yes

TABLE III. Continuation

Compared populations	TH01			TPOX			CSF1PO		
	$\chi^2$	$p$	Homogeneity	$\chi^2$	$p$	Homogeneity	$\chi^2$	$p$	Homogeneity
North-east Poland [13, 14] versus:									
Pomerania-Kujawy [8]	1.43	0.931	Yes	5.59	0.242	Yes	3.45	0.661	Yes
Lower Silesia [3]	2.83	0.732	Yes	9.13	0.059	Yes	1.82	0.883	Yes
Upper Silesia (own research)	9.72	0.092	Yes	3.13	0.545	Yes	4.56	0.486	Yes
South Poland [19]	5.40	0.357	Yes	2.38	0.667	Yes	5.80	0.317	Yes
South Poland [21]	3.19	0.678	Yes	2.24	0.686	Yes	4.57	0.486	Yes
South-east Poland [9]	19.00	0.004	No	2.25	0.685	Yes	8.56	0.113	Yes
Pomerania-Kujawy [8] versus:									
Lower Silesia [3]	3.93	0.554	Yes	3.00	0.538	Yes	8.90	0.136	Yes
Upper Silesia (own research)	7.32	0.203	Yes	2.33	0.697	Yes	9.60	0.081	Yes
South Poland [19]	8.95	0.117	Yes	6.06	0.193	Yes	9.94	0.082	Yes
South Poland [21]	7.00	0.226	Yes	4.36	0.369	Yes	6.47	0.267	Yes
South-east Poland [9]	22.81	0.001	No	12.00	0.018	No	5.95	0.311	Yes
Lower Silesia [3] versus:									
Upper Silesia (own research)	6.56	0.277	Yes	5.32	0.251	Yes	3.17	0.666	Yes
South Poland [19]	9.56	0.066	Yes	13.43	0.006	No	5.35	0.371	Yes
South Poland [21]	7.08	0.227	Yes	9.24	0.049	No	3.94	0.585	Yes
South-east Poland [9]	16.82	0.002	No	12.69	0.006	No	14.01	0.017	No
South Poland [19] versus:									
Upper Silesia (own research)	23.20	0.000	No	1.76	0.798	Yes	2.90	0.731	Yes
South Poland [21]	0.02	1.000	Yes	0.06	1.000	Yes	0.08	1.000	Yes
South-east Poland [9]	9.80	0.085	Yes	11.04	0.019	No	9.01	0.108	Yes
South Poland [21] versus:									
Upper Silesia (own research)	17.96	0.000	No	1.49	0.844	Yes	2.35	0.784	Yes
South-east Poland [9]	6.76	0.276	Yes	8.20	0.084	Yes	5.54	0.379	Yes
South-east Poland [9] versus:									
Upper Silesia (own research)	36.38	0.000	No	9.92	0.056	Yes	14.98	0.010	No
Poland (simultaneous comparison of population samples from different regions)									
–	86.92	0.000	No	38.12	0.094	Yes	47.49	0.080	Yes

Yes –  $p > 0.05$ ; No –  $p < 0.05$ .

Analysing the results of the TH01 locus homogeneity test applied here, one can conclude that significant differences are caused by: different frequencies of occurrence of the three closely migrated alleles, 9, 9.3 and 10, in regional populations [9, 19, 21] and different frequency of the widespread alleles 6 and 9.3 [19, 21]. Difficulties in correct labelling of alleles 9.3 and 10 may be the cause of lack of homogeneity between populations of southern Po-

land (table III). The APLP (the amplified product length polymorphism) method described in the literature [20], which uses a set of three primers for amplification of locus TH01 and leads to fast, unambiguous differentiating of alleles 9, 9.3 and 10, may help to avoid this sort of divergence in the future. Allele 10 occurs in south-east Poland with a frequency of 0.061 [9], whilst in Upper Silesia with a much lower frequency of 0.0021, which is closer to the remaining Polish and European populations [4, 5, 6, 8, 13, 14]. Frequencies obtained for alleles 6 and 9.3 in southern Poland [19, 21] are similar. In other regions in Poland, however, allele 9.3 is most frequent [3, 8, 9, 13], which may also contribute to lack of homogeneity of allelic frequencies at locus TH01 calculated for the whole Polish population (in Carmody's homogeneity test all populations of Poland were compared at the same time – Table III). Disproportions in frequency of occurrence of alleles 6 and 9.3 in different regions of Poland can not be explained by their incorrect phenotyping; an interpretation error in this case is unlikely. However, the observed statistically significant divergences can not be explained only by regional differences (subpopulations), or by the small number of persons studied. One should also take into consideration, for example, incorrect allele typing using commercially available Promega allele ladders (the original ladder does not include allele 9.3) and the imperfect system of amplification products detection. There is a significant concordance between the two population samples from northern Poland [12, 17] and southern Poland [19, 21] analysed in independent laboratories. Perfect concordance can also be observed at loci TPOX and CSF1PO for population samples from the Cracow area [19, 21]; (Table III).

Differences between regions, however, were not found for allele frequency at locus TPOX, which is much easier to phenotype correctly and less variable. At this locus, the population sample from Upper Silesia is homogeneous with other Polish populations (Table II), and with European population samples ( $p > 0.05$ ) [4, 5, 6, 22], but significantly divergent from Asian and Negroid populations ( $p = 0.000$ ) [2, 11]. Comparative analysis of all Polish populations, however, revealed differences in frequencies at locus TPOX between some Polish population samples. Data obtained for the south-east region of Poland [9] are not consistent with data for the Pomerania-Kujawy region [8], southern Poland [19] and Lower Silesia. Allele distributions at locus TPOX for Lower Silesia also differ from those of southern Poland [19, 21]. These differences, however, do not cause a lack of homogeneity of allele frequencies at locus TPOX for the whole Polish population (Table III).

In turn allele frequencies for locus CSF1PO in populations of Upper Silesia and other researched regions of Poland are homogeneous relative to each other, with one exception – south-eastern Poland [9] (Table II). Allele frequencies obtained for locus CSF1PO are also homogeneous in most of the

Polish population samples (Table III). Comparative analysis of allele frequencies obtained for this locus in studied population samples revealed that South-East Poland [9] is significantly divergent from Lower and Upper Silesia [3]. These differences do not influence the homogeneity of the CSF1PO allele frequencies in all studied population samples from Poland (Table III). Statistical data important for paternity testing calculated for the three analysed STR loci are presented in Table IV.

TABLE IV. STATISTICAL PARAMETERS DESCRIBING THREE ANALYSED LOCI: TH01, TPOX AND CSF1PO IN THE POPULATION SAMPLE OF UPPER SILESIA

STR system	$PD$	$MEC$	$MEP$	$PIC$	$Ht_{obs}$	$Ht_{exp}$
TH01	0.8986	0.5325	0.5314	0.7168	0.7625	0.7567 0.0457
TPOX	0.8012	0.3673	0.2678	0.5593	0.5802	0.6128 0.0630
CSF1PO	0.8664	0.4754	0.4635	0.6727	0.7222	0.7251 0.0579
TH01 TPOX CSF1PO	0.9973	0.8448	–	–	–	–

$PD$  – power of discrimination;  $MEC$  – mean exclusion chance (usefulness of the system);  $MEP$  – mean paternity exclusion probability;  $PIC$  – polymorphism information content;  $Ht_{obs}$  – observed heterozygosity;  $Ht_{exp}$  – expected heterozygosity.

These data are not divergent from results obtained for other regions in Poland [3, 8, 9, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 21] and Europe [4, 5, 6, 22]. The total power of discrimination ( $PD$ ) and mean exclusion chance ( $MEC$ ), also known as the usefulness of the system ( $PE$ ), for studied loci equal 0.9973 and 0.8448 respectively. Such values confirm the great usefulness of the systems in disputed paternity cases. Among 111 such cases for which analysis of the triplex CTT (73) or the monoplex TH01 (38) was performed, no mutations or deviations from rules of heredity were noted. However, 10 exclusions of wrongly named men as fathers were noted, among whom in 8 cases exclusion was on the basis of results obtained for TH01, TPOX or CSF1PO STR systems. Most frequently exclusion of the non-fathers was done according to data obtained for locus TH01 (8 cases), less frequently for locus CSF1PO (6 cases) and TPOX (3 cases). These facts, and also the characterisation of usefulness of particular loci in disputed paternity testing presented in Table IV, jointly confirm that triplex CTT is the most useful, and that the most useful individual system is locus TH01.

## References:

1. Asmundo A., Crinó C., Population study of the short tandem repeat polymorphisms HumTH01, HumvWA31, HumFESFPS and HumF13A01 in Sicily (Southern Italy), *International Journal of Legal Medicine* 1998, vol. 111, pp. 281–283.
2. Budowle B., Nhari L. T., Moretti T. R. [et al.], Zimbabwe black population data on the six short tandem repeat loci – CSF1PO, TPOX, TH01, D3S1358, VWA and FGA, *Forensic Science International* 1997, vol. 90, pp. 215–221.
3. Dobosz T., Częstości wybranych genów warunkujących polimorfizm genetyczny w obrębie populacji dolnośląskiej, *Zeszyty Naukowe Akademii Medycznej we Wrocławiu* 1999, t. 74, s. 60–61.
4. Garcia O., Martin P., Budowle B. [et al.], Basque Country autochthonous population data on 7 short tandem repeat loci, *International Journal of Legal Medicine* 1998, vol. 111, pp. 162–164.
5. Garofano L., Pizzamiglio M., Vecchio C. [et al.], Italian population data on thirteen short tandem repeat loci: HUMTH01, D21S11, D18S51, HUMVWFA31, HUMFIBRA, D8S1179, HUMTPOX, HUMCSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, D3S1358, *Forensic Science International* 1998, vol. 97, pp. 53–60.
6. Hantschel M., Hausmann R., Lederer T. [et al.], Population genetics of nine short tandem repeat (STR) loci – DNA typing using the AmpFISTR Profiler PCR amplification kit, *International Journal of Legal Medicine* 1999, vol. 112, pp. 393–395.
7. Kunkel L. M., Smith K. D., Bayer S. H. [et al.], Analysis of human Y-chromosome – specific reiterated DNA in chromosome variants, *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 1977, vol. 74, pp. 1245–1249.
8. Miścicka-Śliwka D., Czarny J., Grzybowski T. [et al.], Population genetics of 14 STRs: vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, F13A01, FESFPS, F13B, LPL, D3S1358, and FGA in the Pomerania-Kujawy region of Poland, [in:] Olaisen B., Brinkmann B., Lincoln P. J. [eds.], *Progress in forensic genetics*, Excerpta Medica, Amsterdam 1998, pp. 261–262.
9. Monies D., Ciesielka M., Kozioł P. [et al.], Częstości alleli sześciu układów STR (CSF1PO, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS, VWA) w populacji Polski południowo-wschodniej, *Postępy Medycyny Sądowej i Kryminologii* 1997, t. 3, s. 253–263.
10. Nagai A., Yamada S., Watanabe Y. [et al.], Analysis of the STR loci HUMF13A01, HUMFXIIB, HUMLIPOL, HUMTH01, HUMTPOX and HUMVWFA31 in a Japanese population, *International Journal of Legal Medicine*, 1996, 109, pp. 34–36.
11. Nata M., Kimura T., Hashiyada M. [et al.], Allele frequencies of eight STRs in Japanese and Chinese, *International Journal of Legal Medicine* 1999, vol. 112, pp. 396–399.
12. Pawłowski R., Maciejewska A., Paszkowska R. [et al.], Frequencies for five short tandem repeat (STR) systems in a population from North Poland, *International Journal of Legal Medicine* 1997, vol. 110, pp. 10–13.



13. Pepiński W., Skawrońska M., Koc E. [et al.], Polimorfizm układu TH01 w populacji Polski północno-wschodniej, *Postępy Medycyny Sądowej i Kryminologii* 1999, t. 5, s. 409–410.
14. Pepiński W., Janica J., Niemcunowicz-Janica A. [et al.], Genetyka populacyjna 9 układów typu STR w regionie Polski północno-wschodniej, Streszczenia z I Sympozjum Hemogenetyki Sądowej, Pieczyska/Bydgoszcz, 11–12 maja 2000 r.
15. Pu C. E., Wu F. C., Cheng C. L. [et al.], DNA short tandem repeat profiling of Chinese population in Taiwan determined by using an automated sequencer, *Forensic Science International* 1998, vol. 97, pp. 47–51.
16. Sueblinvong T., Kongsrisook U., Population data of 8 short tandem repeat loci in the Thai population, *Forensic Science International* 1999, vol. 103, pp. 199–205.
17. Szczerkowska Z., Wysocka J., Polimorfizm dwóch loci STR: HUMTPOX i HUMTH01. Zastosowanie w dochodzeniu ojcostwa, *Annales Academiae Medicae Gedanensis* 1999, vol. 29, s. 25–32.
18. Szczerkowska Z., Wysocka J., Kapińska E., Polimorfizm dwóch loci HUMF13A01 i CSF1PO. Badania populacyjne, zastosowanie w medycynie sądowej, *Annales Academiae Medicae Gedanensis* 2000 [w druku].
19. Turowska B., Sanak M., Badanie częstości alleli niektórych systemów typu STR w populacji Polski południowej, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii* 1998, t. XLVIII, s. 97–102.
20. Watanabe G., Umetsu K., Suzuki T., Determination of the HUMTH01 alleles by the APLP method, *International Journal of Legal Medicine* 1999, vol. 112, pp. 134–135.
21. Wolańska-Nowak P., Application of subpopulation theory to evaluation of DNA evidence, *Forensic Science International* 2000, vol. 113, pp. 63–69.
22. Zupanič I., Balažič J., Komel R., Analysis of nine short tandem repeat (STR) loci in the Slovenian population, *International Journal of Legal Medicine* 1998, vol. 111, pp. 248–250.

# POLIMORFIZM LOCI TYPU STR: TH01, TPOX I CSF1PO W POPULACJI GÓRNEGO ŚLĄSKA; ICH PRZYDATNOŚĆ DO BADAŃ SPORNEGO OJCOSTWA

Ewa RACZEK, Kornelia DRO DZIOK, Jadwiga KABIESZ

## WPROWADZENIE

Układy: TH01 (11p15.5), TPOX (21p13-2pter) i CSF1PO (5q33.5-q34) to wysoce zróżnicowane *loci* DNA typu STR. Ich polimorfizm i przydatność do badań spornego ojcostwa oraz do badań kryminalistycznych wykazano dla wszystkich ras [1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22].

Niniejszą pracę podjęto w celu przedstawienia częstości genowych w tych trzech *loci* w populacji Górnego Śląska i wykazania jej homogenności z innymi regionami Polski.

## MATERIAŁ I METODYKA

Polimorfizm loci: TH01, TPOX i CSF1PO oznaczano wśród niespokrewnionych osób dorosłych z Górnego Śląska (dla lokus TH01 badaniami objęto 240 osobników; dla *loci* TPOX i CSF1PO – 162).

Izolację DNA prowadzono zmodyfikowaną metodą Kunkela i in. [7]. Modyfikacja polegała na zastąpieniu fenolu mieszaniną chloroform : alkohol izoamylowy w stosunku objętościowym 24:1. Stężenie i czystość DNA oznaczano spektrofotometrycznie (spektrofotometr Hitachi, program DNA/protein card 1E).

Amplifikację (amplifikator typ 480 firmy Perkin Elmer), rozdział elektroforetyczny (aparatus do elektroforezy wertykalnej typ SA-32 firmy Life Technologies, 6% denaturujący żel Gene Page Plus firmy Amresco) i barwienie azotanem srebra wykonywano zgodnie z zaleceniami firmy Promega, producenta zestawu do amplifikacji alleli pojedynczego lokus TH01 oraz trzech loci CSF1PO, TPOX i TH01.

Obliczenia statystyczne przeprowadzono w oparciu o programy komputerowe: TFPGA (heterozygotyczność obserwowana i oczekiwana, testy:  $\chi^2$  i exact) oraz Carmody'ego (test homogenności), otrzymane dzięki uprzejmości Pani mgr P. Wolańskiej-Nowak (Instytut Ekspertyz Sądowych w Krakowie) i Pana dra P. Koziola (Katedra Medycyny Sądowej AM w Lublinie).

## WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Polimorfizm badanych układów przedstawia tabela I. W populacji Górnego Śląska w lokus TH01 obserwowano 6 z 8 alleli opisanych w literaturze [5] i 15 fenotypów; w loci TPOX i CSF1PO znaleziono odpowiednio: 5 z 8 [4] i 7 z 10 alleli wymienio-

nych w piśmiennictwie [8, 19]. Obserwowano 11 fenotypów w lokus TPOX i 16 w CSF1PO.

Najczęściej występującym allelem w lokus TH01 w górnośląskiej populacji jest allel 9.3 ( $f = 0,3625$ ), najrzadziej – 10 ( $f = 0,0021$ ). Najczęstsze na Górnym Śląsku fenotypy: 6-9.3 i 9-9.3 pojawiają się z częstością  $f = 0,1667$ , co pozwala stwierdzić, że są one powszechne.

W lokus TPOX w badanej populacji dominują allele 8 ( $f = 0,5556$ ) i 11 ( $f = 0,2562$ ) oraz fenotypy 8-8 ( $f = 0,3333$ ) i 8-11 ( $f = 0,2469$ ). Choć lokus CSF1PO jest bardziej różnorodny (opisano 10 alleli), to najczęstszymi allelami są 12 ( $f = 0,3426$ ) i 10 ( $f = 0,3086$ ), zaś fenotypami 10-12 ( $f = 0,2469$ ) i 11-12 ( $f = 0,1605$ ). W żadnym z badanych loci nie stwierdzono interalleli.

*Loci:* TH01, TPOX i CSF1PO w regionie Górnego Śląska spełniają prawo równowagi Hardy'ego-Weinberga, co wykazują zastosowane testy:  $\chi^2$  i exact liczony metodą Monte Carlo i Markov chain (program komputerowy TFPGA, tabela I), podobnie jak w innych, opisanych w literaturze populacjach Polski, Europy i świata [1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22]. Porównanie częstości występowania alleli w badanych loci w populacji Górnego Śląska i w innych regionach Polski przedstawia tabela II.

Z tabeli tej wynika, iż na poziomie istotności  $p = 0,05$  tylko trzy z badanych populacji Polski mają podobny rozkład alleli jak Górny Śląsk. Są to: Polska północno-wschodnia [13, 14], Pomorze – Kujawy [8] i Dolny Śląsk [3]. Pozostałe polskie populacje posiadają odmienne częstości alleli w układzie TH01. Również Niemcy [6], Słowenia [22] i Hiszpania [4] nie wykazują zgodności z populacją górnośląską pod względem rozkładu alleli w lokus TH01 ( $p < 0,05$  w teście Carmody'ego przy porównaniu tych populacji). Jedynie Włosi [5] mają zbliżony do populacji Górnego Śląska rozkład częstości alleli w TH01 ( $p = 0,015$ ). Obserwuje się również brak jednorodności w rozkładzie alleli między populacją Górnego Śląska a Japonią czy Zimbabwe ( $p = 0,000$ ) [2, 11]. Podobny brak homogenności w lokus TH01 wykazują niektóre polskie populacje regionalne porównywane na zasadzie każda z każdą i wszystkie jednocześnie (tabela III).

Analizując wyniki zastosowanego testu homogenności dla lokus TH01, można zauważyć, że istotne różnice powodują: odmienne częstości występowania trzech blisko siebie leżących alleli: 9, 9.3 i 10 w populacjach regionalnych [9, 19, 21] oraz odmienna częstość powszechnych alleli 6 i 9.3 [19, 21]. Trudności w prawidłowym oznaczeniu alleli 9.3 i 10 mogą być powodem braku homogenności między populacjami szeroko rozumianej południowej Polski (tabela III). Być może opisana w literaturze [20] metoda APLP (*the amplified product length polymorphism*) wykorzystująca zestaw 3 starterów do amplifikacji lokus TH01 i szybkiego, jednoznacznego różnicowania alleli 9, 9.3 i 10, pozwoli w przyszłości uniknąć tego rodzaju rozbieżności. Allel 10 występuje w Polsce południowo-wschodniej [9] z częstością 0,061, zaś na Górnym Śląsku tylko z częstością 0,0021, bliższą pozostałym polskim i europejskim populacjom [4, 5, 6, 8, 13, 14]. Częstości występowania alleli 6 i 9.3 w południowej Polsce [19, 21] są podobne; w pozostałych zaś regionach Polski przeważa allel 9.3 [3, 8, 9, 13], co może również wpływać na brak jednorodności rozkładu alleli w lokus TH01 dla populacji całej Polski (w teście homogenności Carmody'ego porównywano jednocześnie wszystkie populacje Polski – tabela III). Dysproporcji w częstości występowania alleli 6 i 9.3 w różnych regionach Polski nie można przypisać błędnemu fenotypowaniu tychże;

popęlnienie błędu interpretacyjnego jest tu mało prawdopodobne. A jednak zaobserwowane niezgodności – istotne statystycznie – nie mogą być tłumaczone jedynie odmiennością regionalną (subpopulacjami) czy małą liczbą badanych osobników. Należy brać pod uwagę również błędne typowanie alleli w oparciu o dostępne drabiny alleliczne Promegi (w firmowej drabinie nie występuje allel 9.3) czy niedoskonały system detekcji produktów amplifikacji. Znamienna jest wysoka zgodność dwóch populacji Polski północnej [12, 17] i Polski południowej [19, 21] badanych w różnych ośrodkach. Idealną zgodność obserwowano także w *loci* TPOX i CSF1PO dla populacji krakowskich [19, 21] (tabela III).

Nie stwierdzono natomiast odmienności regionalnej w rozkładzie częstości alleli w lokus TPOX, znacznie łatwiejszym w fenotypowaniu i mniej zróżnicowanym. W tym lokus populacja górnośląska jest homogenna z innymi populacjami Polski (tabela II) jak również z populacjami europejskimi ( $p > 0,05$ ) [4, 5, 6, 22]; przejawia natomiast istotną statystycznie odmienność od populacji azjatyckiej i negroidalnej ( $p = 0,000$ ) [2, 11]. Porównanie wszystkich populacji polskich między sobą (tabela III) wskazuje jednak na odmienny rozkład alleli w lokus TPOX w niektórych z nich. Polska południowo-wschodnia [9] nie jest homogenna z populacją Pomorza – Kujaw [8], Polski południowej [19] i Dolnego Śląska [3]; Dolny Śląsk różni się również rozkładem alleli w lokus TPOX od Polski południowej [19, 21]. Te odmienności nie powodują jednak braku jednorodności częstości występowania alleli w lokus TPOX w całej Polsce (tabela III).

Z kolei w lokus CSF1PO populacja górnośląska i pozostałe zbadane regiony Polski z wyjątkiem Polski południowo-wschodniej [9] są względem siebie jednorodne w rozkładzie alleli (tabela II). Homogenność wykazuje również względem siebie w częstości występowania alleli w lokus CSF1PO większość polskich populacji (tabela III). Z porównania rozkładu alleli w tym lokus w badanych populacjach wynika, że Polska południowo-wschodnia [9] jest regionem o statystycznie istotnej odmienności od Dolnego i Górnego Śląska [3]. Te odmienności nie wpływają na jednorodność rozkładu alleli w lokus CSF1PO we wszystkich badanych populacjach Polski (tabela III).

Dane statystyczne istotne dla badań spornego ojcostwa dla trzech badanych *loci* typu STR zebrano w tabeli IV. Dane te nie odbiegają od wyników uzyskanych dla innych regionów Polski [3, 8, 9, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 21] i Europy [4, 5, 6, 22]. Łączna siła dyskryminacji ( $PD$ ) i teoretyczna szansa wykluczenia ojcostwa ( $MEC$ ), zwana inaczej przydatnością układu ( $PE$ ), dla badanych *loci* wynosi odpowiednio 0,9973 i 0,8448, co potwierdza wysoką przydatność tych układów w rozstrzyganiu spraw dotyczących spornego ojcostwa. Wśród 111 takich spraw, w których oznaczano tripleks CTT (73) lub tylko TH01 (38), nie spotkano mutacji ani żadnych odchyłeń od praw dziedziczenia. Odnotowano natomiast 10 wykluczeń niesłusznie pozwanych mężczyzn, wśród których w 8 sprawach wystąpiło również wykluczenie pozwanego na podstawie badania układu TH01, TPOX lub CSF1PO. Najczęściej wyłączano niesłusznie pozwanego mężczyznę na podstawie wyniku uzyskanego dla lokus TH01 (w 8 przypadkach), rzadziej w CSF1PO (w 6) i TPOX (w 3). Te spostrzeżenia oraz przedstawiona w tabeli IV charakterystyka przydatności poszczególnych *loci* w badaniach spornego ojcostwa zgodnie potwierdzają największą przydatność tripleksu CTT, a z pojedynczych układów – TH01.