

POLYMORPHISM OF VNTR LOCI: D2S44, D10S28, D17S59 AND D17S26 IN THE POMERANIA-KUJAWY REGION OF POLAND

Jakub CZARNY

Chair and Department of Forensic Medicine, The Ludwik Medical University, Bydgoszcz

ABSTRACT: This paper presents the results of a population study of 4 VNTR loci: D2S44, D10S28, D17S59 and D17S26. The allele distributions are in accordance with Hardy-Weinberg expectations. Values of heterozygosity, polymorphic information content, power of discrimination, mean exclusion chance and typical paternity index demonstrate that these systems are valuable tools for paternity testing.

KEY WORDS: VNTR; Population genetics; D2S44; D10S28; D17S59; D17S26.

*Problems of Forensic Sciences, vol. LIII, 2003, 109–115
Received 19 February 2003; accepted 27 August 2003*

INTRODUCTION

The DNA sequences known as variable number of tandem repeats (VNTR) and possibilities of their application to genetic individual identification and kinship testing have been described in detail elsewhere [6, 8, 9, 10].

Application of a new genetic marker to identification studies and disputed paternity testing should be preceded by detailed characterisation of its level of polymorphism in a particular population. This work presents the polymorphism of the following VNTR loci: D2S44, D10S28, D17S59 and D17S26 determined in the population of Pomerania-Kujawy.

Locus D2S44 was mapped on chromosome 2, position 2q21.3-2q22 (the repetitive unit: tca gga gca gtg gga agt aca gtg ggg tgt) [5, 7]. Locus D10S28 is situated on chromosome 10 (10pter-10p13) [2] and loci D17S59 and D17S26 were found to be located on 17p11.2-17cen and 17q-17q [15, 14] respectively.

MATERIAL AND METHODS

The study was performed on samples of peripheral blood taken from an elbow vein, which were collected from 132 to 357 (depending on the studied locus) healthy, adult, unrelated individuals, male and female, living in the

region of Pomerania-Kujawy. DNA polymorphism was analysed according to previously described procedures [12] using molecular probes: YNH24 (Promega) for locus D2S44, TBQ7 (Promega) for locus D10S28, probe D17S59 (Promega) for analysis of the locus of the same name and EFD52 (Promega) for analysis of locus D17S26.

RESULTS AND DISCUSSION

Table I presents allele frequencies determined for loci D2S44, D10S28, D17S59 and D17S26, as well as expected heterozygosity (H_e), observed heterozygosity (H_o), polymorphic information content (PIC), discrimination power (PD), mean exclusion chance (MEC), typical paternity index (TPI) and probability of consistency between distribution of observed genotype frequencies and distribution of genotype frequencies calculated on the basis of allele frequencies according to the Hardy-Weinberg law and Fisher exact test (exact p).

For the analysed loci, distributions of the genotype frequencies are consistent ($p > 0.05$) with distributions calculated on the basis of allele frequencies according to the Hardy-Weinberg law.

Amongst the analysed loci, locus D10S28 is the most polymorphic, with the highest number of alleles and highest values for PIC and heterozygosity. As a consequence, the locus is characterised by the highest values of discrimination power (defining the usefulness of a marker for individualisation), mean exclusion chance and typical paternity index (defining the usefulness of a marker for disputed paternity testing). Parallel parameters calculated for locus D17S26 are insignificantly lower. Locus D2S44 is characterised by lower values of all above mentioned parameters in comparison to loci D10S28 and D17S26. The lowest polymorphism was noted for locus D17S59 displaying lowest alleles number, lowest values of PIC and heterozygosity and lowest values of parameters describing usefulness of a marker for individual identification and disputed paternity testing. Polymorphism of the analysed loci has not yet been studied in the Polish population.

The presented results mark the end of the study of polymorphism of 10 VNTR loci in the population of Pomerania-Kujawy: D7S21, D12S11, D1S7 [5], D7S22, D5S43, D16S309, [12], D2S44, D10S28, D17S59 and D17S26. The PIC values for the studied loci vary in the range from 0.93 (D1S7) to 0.70 (D17S59); power of discrimination lies in the range between 0.991 (D1S7) and 0.892 (D17S59); and the mean exclusion chance ranges from 0.895 (D1S7) to 0.427 (D17S59).

TABLE I. POLYMORPHISM OF VNTR LOCI: D2S44, D10S28, D17S59 AND D17S26 IN THE POMERANIA-KUJAWY REGION OF POLAND

Size of DNA fragment (bin)	D2S44 N = 357		D10S28 N = 230		D17S59 N = 186		D17S26 N = 132	
	Number	Frequency	Number	Frequency	Number	Frequency	Number	Frequency
1–526	–	–	–	–	1	0.003	–	–
654–784	–	–	1	0.002	–	–	–	–
911–993	–	–	7	0.015	–	–	–	–
994–1176	–	–	35	0.076	2	0.005	–	–
1177–1287	–	–	4	0.009	2	0.005	–	–
b11288–1431	–	–	8	0.017	–	–	4	0.015
1432–1568	–	–	33	0.072	–	–	62	0.234
1569–1672	–	–	39	0.085	–	–	7	0.027
1673–1861	1	0.001	59	0.128	80	0.215	6	0.023
1862–2015	2	0.003	24	0.052	77	0.207	15	0.057
2016–2213	9	0.013	35	0.076	146	0.393	5	0.019
2214–2433	42	0.059	10	0.022	51	0.137	2	0.008
2434–2650	37	0.052	15	0.033	9	0.024	4	0.015
2651–2876	136	0.190	22	0.048	3	0.008	6	0.023
2877–3101	81	0.113	17	0.037	1	0.003	2	0.008
3102–3397	79	0.111	28	0.061	–	–	3	0.011
3398–3812	77	0.108	37	0.080	–	–	5	0.019
3813–4333	143	0.201	25	0.054	–	–	15	0.057
4334–4716	76	0.106	33	0.072	–	–	20	0.076
4717–5415	21	0.029	17	0.037	–	–	44	0.166
5416–5861	4	0.006	3	0.007	–	–	17	0.064
5862–6442	1	0.001	6	0.013	–	–	19	0.072
6443–7421	4	0.006	1	0.002	–	–	13	0.049
7422–8271	1	0.001	1	0.002	–	–	10	0.038
8272–9416	–	–	–	–	–	–	1	0.004
9417–11919	–	–	–	–	–	–	4	0.015
Σ	714	1.000	460	1.000	372	1.000	264	1.000
<i>He</i>	0.869506		0.933276		0.739342		0.891664	
<i>Ho</i>	0.848739		0.917391		0.698925		0.931818	
<i>SE</i>	0.023916		0.017057		0.054806		0.045213	
<i>PIC</i>	0.85		0.93		0.70		0.88	
<i>PD</i>	0.966		0.987		0.892		0.974	
<i>MEC</i>	0.692		0.831		0.427		0.861	
<i>TPI</i>	3.31		6.05		1.66		7.33	
Exact <i>p</i>	0.265625		0.248750		0.619062		0.993125	

N – number of analysed genotypes; *He* – expected heterozygosity; *Ho* – observed heterozygosity; *SE* – standard error, *PIC* – polymorphic information content; *PD* – power of discrimination, *MEC* – mean exclusion chance; *TPI* – typical paternity index; exact *p* – probability values of exact test for Hardy-Weinberg disequilibrium.

Respective parameters calculated for 20 STR loci: vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, LPL, F13B, FESFPS, F13A01, [11], D3S1358, FGA, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51 and D19S433 [3] are lower: *PIC* ranges from 0.86 to 0.56, *PD* has values from 0.972 to 0.798 and values for *MEC* vary in the range of 0.734–0.318. The only exception is the STR locus ACTBP2, having higher values for all mentioned parameters than locus D1S7. At present individualisation is performed mainly on the basis of STR analysis, whereas southern blot analysis of polymorphic VNTR loci is limited to disputed paternity and kinship testing. Even in this latter area, however, multiplex analysis of STR loci is replacing VNTR analysis [4]. To compare, the total value of *MEC* for 10 VNTR loci is 0.999 999 156, whereas for 20 STR loci *MEC* reaches the value 0.999 999 991.

It is noteworthy, however, that the criteria of binning applied here are very conservative. Application of a smaller binning range [13], particularly in the case of high frequency bins, could significantly improve values of all parameters.

The obtained results indicate that analysed VNTR loci can be a valuable tool for disputed paternity and kinship testing. It seems, however, that the laborious and expensive procedures of polymorphic VNTR loci analysis will only be applied rarely, in special cases such as disputed paternity of children from incestuous relationships or differentiation between two closely related males involved in disputed paternity, in situations where one of the parents is dead etc.

References:

1. Barker D., Wright E., Fain P. [et al.], Thirty new chromosome 17 DNA markers, *Cytogenetics and Cell Genetics* 1987, vol. 46, p. 576.
2. Bragg T., Nakamura Y., Jones C. [et al.], Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence (cTBQ7) on chromosome 10 [D10S28], *Nucleic Acids Research* 1988, vol. 16, p. 11395.
3. Czarny J., Population genetics of the STRs D3S1358, FGA, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51 and D19S433 in the Pomerania-Kujawy region of Poland, *Forensic Science International* 2002, vol. 125, pp. 90–92.
4. Czarny J., Miścicka-Śliwka D., Berent J. A. [et al.], Ocena praktycznej przydatności multipleksowej analizy 12 loci STR zawartych w systemach „GenePrint PowerPlex 1.2 Fluorescent STR System” i „GenePrint FFFL Fluorescent STR System” w dochodzeniu ojcostwa, *Archiwum medycyny sądowej kryminologii* 1999, t. 49, s. 225–231.
5. Czarny J., Miścicka-Śliwka D., Woźniak M. [et al.], Polimorfizm loci VNTR: D7S21, D12S11 i D1S7 w populacji kujawsko-pomorskiej, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 2001, t. 51, s. 233–238.
6. Gill P., Jeffreys A. J., Werrett D. J., Forensic application of DNA “fingerprints”, *Nature* 1985, vol. 318, pp. 577–579.

7. Holmlund G. M., Marttila M., Bezpośrednie przedłożenie do GenBank, Numer dostępu AJ001534.
8. Jeffreys A. J., Brookfield J. F. Y., Semeonoff R., Positive identification of an immigration test-case using human DNA Fingerprints, *Nature* 1985, vol. 317, pp. 818–819.
9. Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L., Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA, *Nature* 1985, vol. 314, pp. 67–73.
10. Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L., Individual-specific “fingerprints” of human DNA, *Nature* 1985, vol. 316, pp. 76–79.
11. Miścicka-Śliwka D., Czarny J., Grzybowski T. [et al.], Population genetics of the STRs vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, LPL, F13B, FESFPS, F13A01 and ACTBP2 in the Pomerania-Kujawy region of Poland, *Forensic Science International* 2001, vol. 119, pp. 119–122.
12. Miścicka-Śliwka D., Czarny J., Polymorphism of the VNTR loci: D7S22, D5S433 and D16S309 in the Pomerania-Kujawy Region of Poland, *Problems of Forensic Sciences* 2001, vol. 48, pp. 65–73.
13. Monson K. L., Budowle B., A comparison of the fixed bin method with the floating bin and direct count methods: effect of VNTR profile frequency estimation and reference population, *Journal of Forensic Sciences* 1993, vol. 38, pp. 1037–1050.
14. Nakamura Y., Fujimoto E., O’Connell P. [et al.], Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence cEFD52 on chromosome 17q [D17S26], *Nucleic Acids Research* 1988, vol. 16, p. 786.
15. Nakamura Y., Gillilan S., O’Connell P. [et al.], Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence pYNH24 on chromosome 2 (D2S44), *Nucleic Acids Research* 1987, vol. 15, p. 10073.

POLIMORFIZM *LOCI* VNTR: D2S44, D10S28, D17S59 I D17S26 W POPULACJI KUJAWSKO-POMORSKIEJ

Jakub CZARNY

WSTĘP

Sekwencje typu VNTR (ang. variable number of tandem repeats) oraz możliwości ich wykorzystania do identyfikacji osobniczej i ustalania pokrewieństwa zostały już dokładnie scharakteryzowane [6, 8, 9, 10].

Wprowadzenie nowego markera genetycznego do badań identyfikacyjnych i ustalania spornego ojcostwa powinno być poprzedzone dokładną charakterystyką jego polimorfizmu w danej populacji. W niniejszej pracy zaprezentowano polimorfizm *loci* VNTR: D2S44, D10S28, D17S59 i D17S26 w populacji kujawsko-pomorskiej.

Lokus D2S44 zostało zmapowane w 2q21.3-2q22 (jednostka repetytywna: tca gga gca gtg gga agt aca gtg ggg tgt) [5,7]. Lokus D10S28 leży w 10pter-10p13 [2], natomiast *loci* D17S59 i D17S26 zmapowane zostały odpowiednio w 17p11.2-17cen i 17q-17q [15, 14].

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pobrana z żyły łokciowej od 132 do 357 (w zależności od badanego lokus) zdrowych, dorosłych, niespokrewnionych osób, mężczyzn i kobiet z regionu kujawsko-pomorskiego.

Analizę polimorfizmu DNA przeprowadzono zgodnie z wcześniej opisanymi procedurami [12], wykorzystując sondy molekularne: YNH24 (Promega) dla analizy lokus D2S44, TBQ7 (Promega) dla analizy lokus D10S28, D17S59 (Promega) dla analizy tegoż lokus i EFD52 (Promega) dla analizy lokus D17S26.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Częstości alleliczne w *loci* D2S44, D10S28, D17S59 i D17S26, heterozygotyczność oczekiwaną (*He*), heterozygotyczność obserwowaną (*Ho*), zawartość informacji polimorficznej (*PIC*), siłę dyskryminacji (*PD*), teoretyczną szansę wykluczenia niesłusznie pozwanego mężczyzny (*MEC*) i teoretyczną średnią szansę ojcostwa (*TPI*) oraz prawdopodobieństwo zgodności rozkładu obserwowanych częstości genotypów z rozkładem częstości genotypów wyznaczonych w oparciu o częstości alleliczne według reguły Hardy'ego-Weinberga na podstawie testu dokładnego Fishera (exact *p*) przedstawiono w tabeli I.

Obserwowane w analizowanych *loci* rozkłady częstości genotypów są zgodne ($p > 0,05$) z rozkładami wyznaczonymi w oparciu o częstości alleliczne według reguły Hardy'ego-Weinberga.

Spśród analizowanych układów locus D10S28 charakteryzuje się najwyższym polimorfizmem przejawiającym się największą liczbą alleli oraz najwyższą wartością *PIC* i heterozygotycznością. Odzwierciedleniem tego faktu są najwyższe wartości siły dyskryminacji (określającej przydatność markera dla potrzeb identyfikacji osobniczej), teoretycznej szansy wykluczenia niesłusznie pozwanego mężczyzny i teoretycznej średniej szansy ojcostwa (określające przydatność markera dla potrzeb dochodzenia spornego ojcostwa). Analogiczne parametry dla locus D17S26 są nieznacznie niższe. Locus D2S44 charakteryzują niższe aniżeli w przypadku loci D10S28 i D17S26 wartości wszystkich wymienionych parametrów. Najniższym polimorfizmem spośród analizowanych loci charakteryzuje się locus D17S59, czego wyrazem jest najmniejsza liczba alleli, najniższe wartości *PIC* i heterozygotyczności oraz najniższe wartości parametrów określających przydatność markera do potrzeb identyfikacji osobniczej i dochodzenia spornego ojcostwa. Polimorfizm badanych loci nie był dotychczas analizowany w populacji polskiej.

Prezentowane wyniki zamykają badania nad polimorfizmem 10 loci VNTR w populacji kujawsko-pomorskiej: D7S21, D12S11, D1S7 [5], D7S22, D5S43, D16S309 [12], D2S44, D10S28, D17S59 i D17S26. Wartości *PIC* dla badanych loci wahają się w zakresie 0,93 (D1S7) a 0,70 (D17S59); siła dyskryminacji zawiera się w granicach pomiędzy 0,991 (D1S7) a 0,892 (D17S59), natomiast teoretyczna szansa wykluczenie niesłusznie pozwanego mężczyzny przyjmuje wartości od 0,895 (D1S7) do 0,427 (D17S59).

Analogiczne parametry wyznaczone dla 20 loci STR: vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, LPL, F13B, FESFPS, F13A01 [11], D3S1358, FGA, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51 i D19S433 [3] są niższe: *PIC* zawiera się w granicach między 0,86 a 0,56, *PD* przyjmuje wartości od 0,972 do 0,798, natomiast wartości *MEC* wahają się od 0,734 do 0,318. Wyjątkiem jest locus ACTBP2, dla którego wszystkie parametry są wyższe aniżeli dla locus D1S7. Obecnie identyfikacja osobnicza prowadzona jest w oparciu o analizę polimorfizmu loci STR, natomiast analiza polimorfizmu loci VNTR w oparciu o technikę *southern blot* jest jeszcze wykorzystywana w badaniach wykonywanych dla potrzeb ustalania ojcostwa i pokrewieństwa, choć i w tej dziedzinie coraz szersze zastosowanie znajduje multipleksowa analiza loci STR [4]. Dla porównania, łączna wartość *MEC* dla 10 loci VNTR wynosi 0,999 999 156, natomiast dla 20 loci STR 0,999 999 991.

Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że przyjęte kryteria binowania są bardzo konserwatywne. Zastosowanie mniejszego przedziału binowania [13], szczególnie w przypadku binów o dużej częstości, mogłoby znacząco zwiększyć wartości wszystkich parametrów.

Uzyskane wyniki wskazują, że analizowane loci VNTR mogą być cennym narzędziem w ustalaniu ojcostwa i pokrewieństwa. Jednak wydaje się, że z uwagi na kosztowność i pracochłonność, analiza polimorfizmu loci VNTR będzie wykorzystywana wyjątkowo, np. w przypadku ustalania ojcostwa dzieci zrodzonych ze związków kazirodczych lub gdy konieczne jest rozstrzygnięcie o ojcostwie jednego z dwóch blisko spokrewnionych mężczyzn, w wypadkach, gdy któreś z rodziców nie żyje itp.