

**Marta Czarnogórska, Marek Sanak¹, Danuta Piniewska, Nina Polańska,
Agnieszka Stawowiak, Barbara Opolska-Bogusz**

Identyfikacja rzadkich wariantów genetycznych w *loci* DXS10074, DXS10079, DXS10146 oraz DXS10148 multipleksu Investigator Argus X-12 w populacji Polski południowej

Identification of rare genetic variants at DXS10074, DXS10079, DXS10146 and DXS10148 *loci* of Investigator Argus X-12 multiplex in the South Polish population

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej UJ CM

Kierownik: prof. dr hab. n. med. M. Kłys

¹ Z Zakładu Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej II Katedry Chorób Wewnętrznych UJ CM

Kierownik: prof. dr hab. med. M. Sanak

W ostatnich latach analiza mikrosatelitarnych *loci* typu STR zlokalizowanych na chromosomie X (X-STR), obok rutynowo stosowanych markerów autosomalnych oraz chromosomu Y, jest coraz częściej wykorzystywana w badaniach sędowo-lekarskich. Ich przydatność potwierdzają wysokie parametry biostatystyczne uzyskiwane dla różnych populacji ludzkich. Prowadzenie tego rodzaju badań populacyjnych dla poszczególnych grup etnicznych, pozwala również na ujawnienie występowania rzadkich wariantów genetycznych, zdefiniowanych jako nieobecne we wzorcach alleli dostępnych w komercyjnych zestawach multipleksowych. Obecność rzadkich alleli z jednej strony może przyczyniać się do zwiększenia wartości dowodowej ekspertyzy, z drugiej natomiast stwarza niekiedy trudności w interpretacji uzyskanych wyników. W zaprezentowanej pracy, posługując się zestawem Investigator Argus X-12, przebadano 200 próbek DNA pobrane od niespokrewnionych kobiet i mężczyzn z Polski południowej. Analiza markerów X-STR ujawniła siedem rzadkich wariantów genetycznych: DXS10074*15.2, DXS10079*24, DXS10146*38.2, DXS10146*47.2, DXS10148*17, DXS10148*21.1 oraz DXS10148*22, które dotychczas nie były opisane w populacji polskiej. Dodatkowo, sprawdzono czy wspomniane allele zostały odziedziczone przez potomstwo badanych osób.

In recent years, the analysis of X-linked short tandem repeats (X-STR), beside autosomal and Y-chromosomal STR loci, has become widely used in forensic genetic investigations. The usefulness of X-STRs markers in forensic medicine is confirmed by their high biostatistical parameters obtained for different populations. Such population studies performed on particular ethnic groups allow for demonstrating the presence of, rare genetic variants that are not included in the allelic ladders of commercially available multiplex kits. The presence of these alleles can increase the power of evidence. On the other hand, the off-ladder alleles can be sometimes difficult to interpret. In this paper, X-STRs analysis was performed in a population sample of 200 unrelated females and males from the Southern Poland using Investigator Argus X-12 Kit. Seven rare off-ladder alleles were encountered: DXS10074*15.2, DXS10079*24, DXS10146*38.2, DXS10146*47.2, DXS10148*17, DXS10148*21.1 and DXS10148*22 that were not previously reported in the Polish population. Additionally, genetic transmission of these genetic variants was ascertained.

Słowa kluczowe:

chromosom X, markery X-STR,
warianty genetyczne: DXS10074*15.2,
DXS10079*24, DXS10146*38.2,

DXS10146*47.2, DXS10148*17,
DXS10148*21.1, DXS10148*22

Key words:

chromosome X, X-STRs markers,
genetic variants: DXS10074*15.2,
DXS10079*24, DXS10146*38.2,
DXS10146*47.2, DXS10148*17,
DXS10148*21.1, DXS10148*22

WSTĘP

W genetyce sądowej w rutynowych badaniach DNA stosuje się markery mikrosatelitarne zlokalizowane zarówno na chromosomach autosomalnych jak i na chromosomie Y. W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się również na analizę polimorficznych *loci* chromosomu X, ze względu na ich dużą przydatność w badaniach identyfikacyjnych, badaniach stopnia pokrewieństwa, w ustalaniu spornego ojcostwa i macierzyństwa oraz w analizie śladów biologicznych. Markery genetyczne typu X-STR okazały się szczególnie pomocne w badaniach dotyczących pokrewieństwa i identyfikacji, gdy przynajmniej jedna z badanych osób jest płci żeńskiej (np. matka-córka, matka-syn, ojciec-córka), jak również w analizie spraw przestępstw kazirodzych lub gdy domniemani ojcowie są ze sobą blisko spokrewnieni. W takich przypadkach stosowany rutynowo zakres markerów autosomalnych często może nie dostarczyć jednoznacznego rozstrzygnięcia [1].

Ponieważ markery X-STR znajdują się na tym samym chromosomie, istnieje możliwość występowania pomiędzy nimi tzw. nierównowagi sprzężeń (LD; ang. *linkage disequilibrium*). Oznacza to, że allele należące do różnych *loci*, w przypadku ich bliskiego sąsiedztwa mogą być odziedziczone razem. Zjawisko to nie jest źródłem błędu w opinio-waniu sądowo-lekarskim, aczkolwiek konieczne jest jego uwzględnienie w obliczeniach biostatystycznych, bowiem ilorazy szans przyjmują w przypadku układów sprzężonych mniejsze wartości niż dla układów dziedziczonych niezależnie. W związku z powyższym stosowane aktualnie markery X-STR zawarte w komercyjnych zestawach multipleksowych zostały zakwalifikowane do czterech grup sprzężeń (ang. *linkage groups*). Allele układów należących do różnych grup sprzężeń są dziedzicz-

ne (segregują) niezależnie ze względu na częste wymiany segmentów siostrzanych chromatyd. Markery należące do tej samej grupy teoretycznie powinny być rozpatrywane jako dziedziczone wspólnie haplotypy, jednakże z powodu tempa mutacji *loci* X-STR, stwierdzono dla niektórych z tych układów brak istotnego sprzężenia genetycznego [2, 3].

Dotychczas badania polimorfizmu *loci* X-STR można było przeprowadzić przy użyciu dwóch komercyjnych zestawów multipleksowych: Mentype® Argus X-UL i Mentype® Argus X-8 (Biotype, Niemcy), pozwalających na równoczesną analizę genotypu czterech lub ośmiu *loci* X-STR oraz markera płci – amelogeniny [4]. W ostatnim czasie na rynek wprowadzono nowy zestaw Investigator Argus X-12 firmy Qiagen, który umożliwia jednoczesną amplifikację dwunastu *loci* X-STR i *locus* amelogeniny. Zestaw ten zawiera po trzy *loci* z każdej grupy sprzężeń, a mianowicie: DXS8378-DXS10135-DXS10148 z grupy 1 (Xp22), DXS7132-DXS10134-DXS10079 z grupy 2 (Xq11), HPRTB -DXS10101-DXS10103 z grupy 3 (Xq26) oraz DXS7423-DXS100749-DXS10146 z grupy 4 (Xq28) [5].

W niniejszej pracy przedstawiono rzadkie warianty genetyczne, które zaobserwowano w czterech spośród dwunastu *loci* chromosomu X zbadanych zestawem Investigator Argus X-12: DXS10074 (allel 15.2), DXS10079 (allel 24), DXS10146 (allele 38.2 i 47.2) oraz DXS10148 (allele 17, 21.1 i 22). Dodatkowo, sprawdzono czy ujawnione warianty zostały przekazane potomstwu, badając dzieci, których matki posiadały wymienione rzadkie allele.

MATERIAŁY I METODY

Materiałem do badań były wymazy z błony śluzowej jamy ustnej pobrane od stu kobiet oraz stu mężczyzn, którzy zgłosili się do Zakładu Medycyny Sądowej w celu ustalenia spornego ojcostwa i wyrazili pisemną zgodę na przeprowadzenie badania. W przypadku stwierdzenia rzadkiego wariantu genetycznego, badaniem objęto również dzieci w celu określenia czy rzadki allel został przekazany potomstwu. Ekstrakcję genomowego DNA przeprowadzono metodą enzymatyczną z użyciem kolumn jonowymiennych posługując się zestawem Sherlock AX (A&A Biotechnology, Gdańsk). Badanie w zakresie polimorfizmu *loci* STR ludzkiego chromosomu X

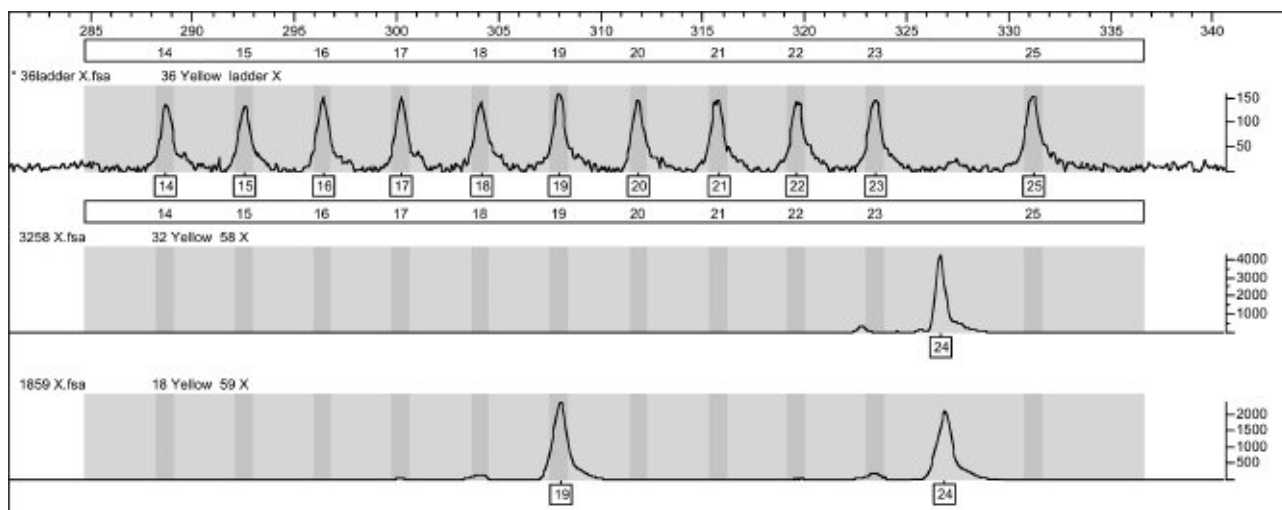
wykonano amplifikując fragmenty DNA z użyciem zestawu Investigator Argus X-12 Kit firmy Qiagen, zgodnie z zaleceniami producenta zestawu.

Amplifikowane produkty multipleksowej reakcji PCR rozdzielano elektroforetycznie w 6% poliakrylamidowym żelu denaturującym (Amresco, USA) z wykorzystaniem sekwenatora ABI Prism 377 (Applied Biosystems, USA), stosując przygotowaną uprzednio macierz kompensacji kolorów i wewnętrzny standard wielkości DNA – Size Standard 550 (BTO). Wielobarwny obraz żelu analizowano przy użyciu oprogramowania GeneScan Analysis 3.7 NT. Przyporządkowanie nazw alleli przeprowadzono z wykorzystaniem programu komputerowego ABI Prism Genotyper 3.7 NT porównując je z odpowiednimi wzorcami allelicznymi dostarczonymi wraz z zestawem Investigator Argus X-12.

WYNIKI

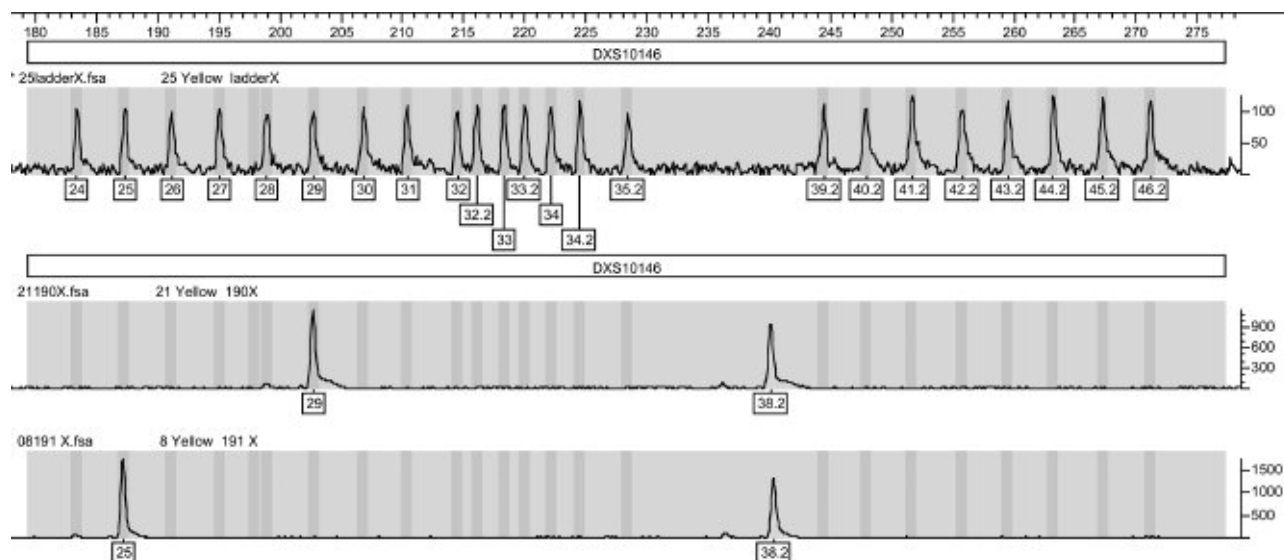
Dla grupy dwustu przebadanych osób ustalono pełne genotypy w zakresie wszystkich dwunastu *loci* X-STR oraz *locus* amelogeniny zawartych

w zestawie Investigator Argus X-12. U dziewięciu kobiet oraz dwóch mężczyzn stwierdzono występowanie wariantów genetycznych nieuwzględnionych we wzorcu alleli dostarczonym przez producenta zestawu. Rzadkie allele wykazano dla markerów: DXS10074 (allel 15.2), DXS10079 (allel 24), DXS10146 (dwukrotnie allele 38.2 i allel 47.2) oraz DXS10148 (dwukrotnie allele 17, trzykrotnie allele 21.1 i allel 22). W przypadku kobiet dodatkowo ustalono genotypy ich dzieci (pięcioro płci męskiej i czworo płci żeńskiej), aby sprawdzić czy wyżej wymienione warianty zostały przekazane potomstwu. Dla obu mężczyzn, ze względu na płeć męską ich dzieci, takie badanie nie było możliwe. We wszystkich zbadanych układach dzieci dziedziczyły allele matczyne, przy czym u pięciorga stwierdzono segregację rzadkich alleli matczynych: DXS10079*24 (matka: 19-24, syn: 24) (ryc. 1), DXS10146*38.2 (matka: 25-38.2, córka: 29-38.2) (ryc. 2), DXS10148*17 (matka: 17-26.1, syn: 17) (ryc. 3), DXS10148*21.1 (matka: 21.1-24.1, syn: 21.1) (ryc. 4) oraz DXS10148*22 (matka: 22-23.1, córka: 22-24.1) (ryc. 5).



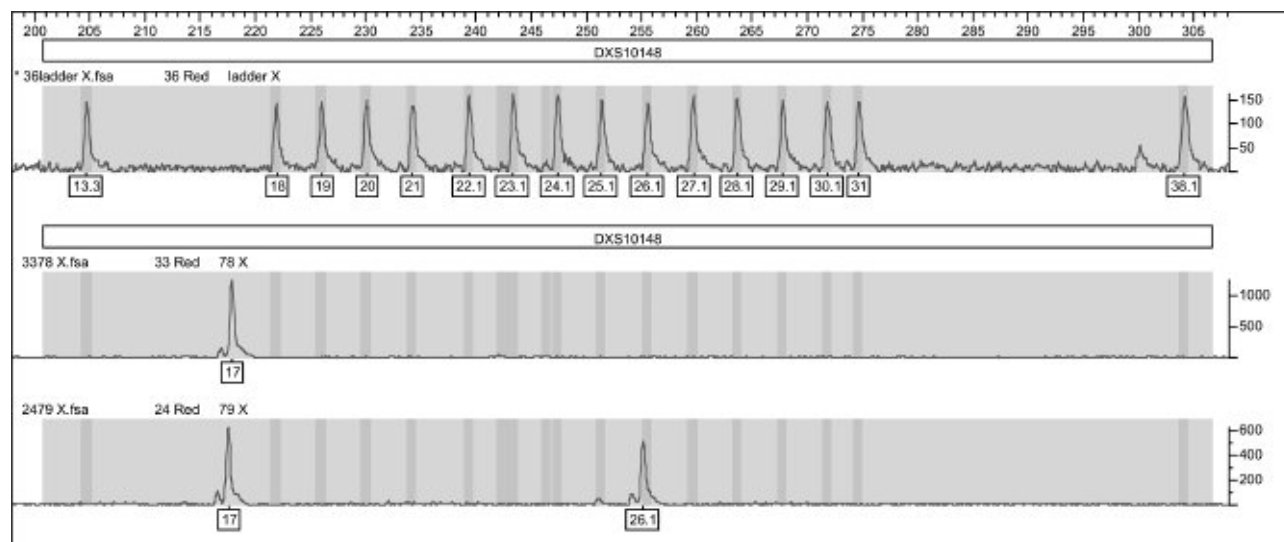
Ryc. 1. Elektroforegram prezentujący allel 24 w locus DXS10079 wraz ze wzorcem alleli w badaniu przy użyciu zestawu Investigator Argus X-12. Próbkę 58, 59 odpowiadają odpowiednio dziecku i matce.

Fig. 1. Electrophoregram presenting the allele 24 in DXS10079 locus with the allelic ladder in the analysis using Investigator Argus X-12 Kit. Samples 58, 59 correspond to the child and mother, respectively.



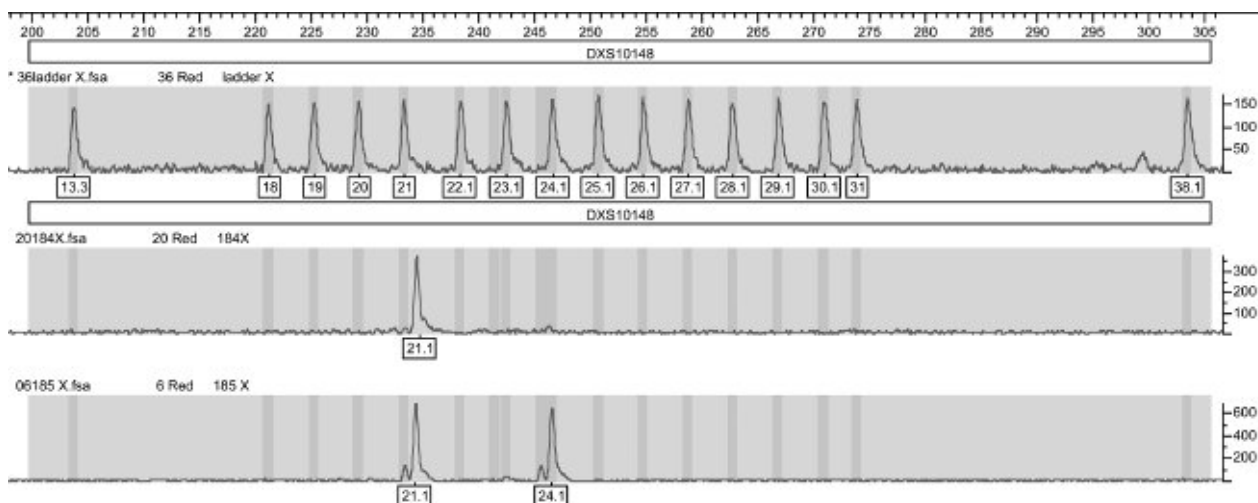
Ryc. 2. Elektroforegram prezentujący allel 38.2 w locus DXS10146 wraz ze wzorcem alleli w badaniu przy użyciu zestawu Investigator Argus X-12. Próbkki 190, 191 odpowiadają odpowiednio dziecku i matce.

Fig. 2. Electrophoregram presenting the allele 38.2 in DXS10146 locus with the allelic ladder in the analysis using Investigator Argus X-12 Kit. Samples 190, 191 correspond to the child and mother, respectively.



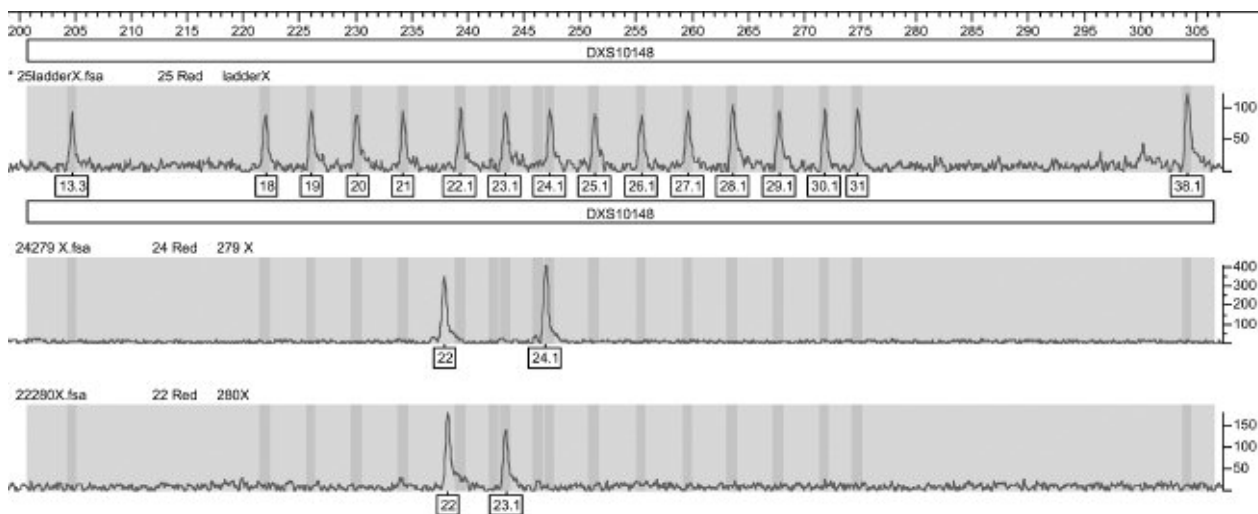
Ryc. 3. Elektroforegram prezentujący allel 17 w locus DXS10148 wraz ze wzorcem alleli w badaniu przy użyciu zestawu Investigator Argus X-12. Próbkki 78, 79 odpowiadają odpowiednio dziecku i matce.

Fig. 3. Electrophoregram presenting the allele 17 in DXS10148 locus with the allelic ladder in the analysis using Investigator Argus X-12 Kit. Samples 78, 79 correspond to the child and mother, respectively.



Ryc. 4. Elektroforegram prezentujący allel 21.1 w locus *DXS10148* wraz ze wzorcem alleli w badaniu przy użyciu zestawu Investigator Argus X-12. Próbkę 184, 185 odpowiadają odpowiednio dziecku i matce.

Fig. 4. Electrophoregram presenting the allele 21.1 in *DXS10148* locus with the allelic ladder in the analysis using Investigator Argus X-12 Kit. Samples 184, 185 correspond to the child and mother, respectively.



Ryc. 5. Elektroforegram prezentujący allel 22 w locus *DXS10148* wraz ze wzorcem alleli w badaniu przy użyciu zestawu Investigator Argus X-12. Próbkę 279, 280 odpowiadają odpowiednio dziecku i matce.

Fig. 5. Electrophoregram presenting the allele 22 in *DXS10148* locus with the allelic ladder in the analysis using Investigator Argus X-12 Kit. Samples 279, 280 correspond to the child and mother, respectively.

DYSKUSJA

Wprowadzenie nowych markerów genetycznych do rutynowej praktyki sądowej wymaga uprzedniego przeprowadzenia badań populacyjnych możliwie jak największej grupy osób. Badania takie są niezbędne w celu określenia częstości allelicznych w poszczególnych populacjach oraz do obliczenia podstawowych parametrów biostatystycznych, które pozwalają na oszacowanie wartości dowodowej ekspertyzy przeprowadzonej z użyciem tych markerów.

Loci DXS10074 oraz DXS10079 zlokalizowane są na długim ramieniu chromosomu X (Xq12), wzorzec alleli dla pierwszego układu składa się z 17 fragmentów DNA o długości od 104 do 172 par zasad (zakres alleli 4-21), zaś dla drugiego z 11 fragmentów DNA o długości od 290 do 333 par zasad (zakres alleli 14-25). Z kolei wzorzec alleliczny dla znajdującego się na ramieniu krótkim chromosomu X (Xp22.31) locus DXS10148 zawiera 16 fragmentów o długości od 207 do 305 par zasad (zakres alleli 13.3-38.1), a dla locus DXS10146 (Xq28) 23 fragmenty o długości 188 do 275 par zasad (zakres alleli 24-46.2) [5]. W wykonanej analizie polimorfizmu loci X-STR stwierdzono obecność siedmiu wariantów genetycznych, które mieszczą się w zakresie alleli wzorca dostarczonego przez producenta zestawu, aczkolwiek żaden z wymienionych wariantów nie został w nim uwzględniony. Ostateczne potwierdzenie występowania tych alleli w badanych próbkach wymagałoby jednak wykonania bezpośredniego sekwencjonowania produktów reakcji PCR. Pozwoliłoby to również na dokładne sprecyzowanie czy zmiana dotyczy motywu powtórzeniowego, czy ewentualnie regionu flankującego rdzeń sekwencji mikrosatelitarnej. Warianty genetyczne nieobecne we wzorcu alleli mogą być bowiem wynikiem insercji/delecji całej jednostki powtórzeniowej lub też występować jako tzw. „mikrowarianty” powstałe na skutek insercji/delecji pojedynczych nukleotydów. Stosunkowo rzadko zdarza się, aby takie allele znajdowały się w zakresie wielkości sąsiedniego locus, co mogłoby prowadzić do błędnej interpretacji wyników [6].

Analiza piśmiennictwa wykazała, że wariant DXS10079*24 został opisany w populacji niemieckiej z częstością 0,0007 (badaną próbę stano-

wiło 693 mężczyzn i 328 kobiet) [7]; w populacji brazylijskiej z Rio de Janeiro z częstością 0,002 (220 mężczyzn i 122 kobiety) [8] oraz w populacji koreańskiej z częstością 0,0083 (300 mężczyzn i 150 kobiet) [9]. Wariant DXS10074*15.2 występował z częstością 0,006 w populacji włoskiej (80 kobiet) [10] oraz 0,0169 w populacji Ghany (59 mężczyzn) [11]. Dla locus DXS10148 częstość populacyjna allele 17 wynosi 0,0033 dla populacji koreańskiej (300 mężczyzn i 150 kobiet) [9] oraz 0,038 dla populacji algierskiej (104 mężczyzn i 106 kobiet) [12]; częstość allele 21.1 wynosi 0,011 w populacji niemieckiej (380 przebadanych chromosomów X) [13]; 0,0233 w populacji koreańskiej (300 mężczyzn i 150 kobiet) [9] oraz 0,006 w populacji algierskiej (104 mężczyzn i 106 kobiet) [12], zaś częstość allele 22 w populacji niemieckiej 0,005 (380 przebadanych chromosomów X) [13] oraz 0,006 w populacji algierskiej (104 mężczyzn i 106 kobiet) [12]. Z kolei wariant DXS10146*38.2 występował z częstością 0,006 w populacji algierskiej (104 mężczyzn i 106 kobiet) [12] a wariant DXS10146*47.2 z częstością 0,003 w populacji algierskiej (104 mężczyzn i 106 kobiet) [12] oraz 0,006 w populacji włoskiej (80 kobiet) [10]. W populacji polskiej markery DXS10079, DXS10146 i DXS10148 nie były jak dotąd analizowane, a dla układu DXS10074 badanego przez niektóre ośrodki w Polsce, nie ujawniono wariantu 15.2 [14, 15]. Oszacowane częstości zidentyfikowanych wariantów genetycznych w populacji Polski południowej zamieszczono w tabeli I.

Stosowane w badaniach sądowo-lekarskich komercyjne zestawy multipleksowe zawierają wzorce alleliczne, które swoim zakresem obejmują najczęściej występujące warianty genetyczne ujawnione w badaniach dla poszczególnych populacji ludzkich. Objęcie takimi analizami coraz to liczniejszych grup osób zwiększa szansę zaobserwowania wariantów genetycznych nieuwzględnionych dotychczas we wzorcu. Stwarza to konieczność dokładnej analizy każdego z uzyskiwanych sygnałów fluorescencyjnych, nawet jeżeli znajdują się one poza obszarem alleli zarezerwowanych dla wzorca. W badaniach dotyczących ustalenia spornego ojcostwa, pokrewieństwa oraz badaniach identyfikacyjnych, odziedziczenie rzadkiego allele podnosi znacznie wartość dowodową ekspertyzy, przy czym

duże znaczenie ma tutaj wyznaczenie częstości populacyjnej takiego wariantu, co wymaga prze- badania odpowiednio dużej liczby niespokrewnionych osób.

Tabela 1. Częstości zidentyfikowanych wariantów allelicznych w populacji Polski południowej (100 kobiet i 100 mężczyzn).

Table 1. Frequencies of identified allelic variants in the South Polish population (100 females and 100 males).

Locus	Allele	Częstość / Frequency
DXS10074	15,2	0,0033
DXS10079	24	0,0033
DXS10146	38,2	0,0067
	47,2	0,0033
DXS10148	17	0,0067
	21,1	0,01
	22	0,0033

PIŚMIENNICTWO

1. Krawczak M.: Kinship testing with X-chromosomal markers: Mathematical and statistical issues. *Forensic Sci Int Genet.* 2007, 1, 111-114.

2. Tillmar A. O., Mostad P., Egeland T., Lindblom B., Holmlund G., Montelius K.: Analysis of linkage and linkage disequilibrium for eight X-STR markers. *Forensic Sci Int Genet.* 2008, 3, 37-41.

3. Luo H. B., Ye Y., Wang Y. Y., Liang W. B., Yun L. B., Liao M., Yan J., Wu J., Li Y. B., Hou Y. P.: Characteristics of eight X-STR loci for forensic purposes in the Chinese population. *Int J Legal Med.* 2011, 1, 127-131.

4. Mentype Argus X-8 PCR Amplification Kit, Manual, 2010.

5. Investigator Argus X-12 Handbook, April 2010.

6. Grubwieser P., Mühlmann R., Niederstätter H., Pavlic M., Parson W.: Unusual variant alleles in commonly used short tandem repeat loci. *Int J Legal Med.* 2005, 119, 164-166.

7. Hering S., Augustin C., Edelmann J., Heidel M., Dressler J., Rodig H., Kuhlisch E., Szibor R.: DXS10079, DXS10074 and DXS10075 are STRs located within a 280-kb region of Xq12 and provide stable haplotypes useful for complex kinship cases. *Int J Legal Med.* 2006, 120, 337-345.

8. Ferreira da Silva I. H., Barbosa A. G., Azevedo D. A., Sánchez-Diz P., Gusmão L., Tavares C. C., Carvalho E. F., Ferreira da Silva L. A.: An X-chromosome pentaplex in two linkage groups: Haplotype data in Alagoas and Rio de Janeiro populations from Brazil. *Forensic Sci Int Genet.* 2010, 4, 95-100.

9. Jeong Eun Sim, Hwan Young Lee, Woo Ick Yang, Kyoung-Jin Shin: Population genetic study of four closely-linked X-STR trios in Koreans. *Mol Biol Rep* 2010, 37, 333-337.

10. Inturri S., Menegon S., Amoroso A., Torre C., Robino C.: Linkage and linkage disequilibrium analysis of X-STRs in Italian families. *Forensic Sci Int Genet.* 2010.

11. Becker D., Rodig H., Augustin C., Edelmann J., Gotz F., Hering S., Szibor R., Brabetz W.: Population genetic evaluation of eight

X-chromosomal short tandem repeat loci using Mentype Argus X-8 PCR amplification kit. *Forensic Sci Int Genet.* 2008, 69–74.

12. Bekada A., Benhamamouch S., Boudjema A., Fodil M., Menegon S., Torre C., Robino C.: Analysis of 21 X-chromosomal STRs in an Algerian population sample. *Int J Legal Med* 2010, 124, 287–294.

13. Hundertmark T., Hering S., Edelmann J., Augustin C., Plate I., Szibor R.: The STR cluster DXS10148–DXS8378–DXS10135 provides

a powerful tool for X-chromosomal haplotyping at Xp22. *Int J Legal Med* 2008, 122, 489–492.

14. Łuczak S., Rogalla U., Malyarchuk B. A., Grzybowski T.: Diversity of 15 human X chromosome microsatellite loci in Polish population. *Forensic Sci Int Genet* 2011.

15. Branicki W., Wolańska-Nowak P., Parys-Proszek A., Kupiec T.: Application of the Mentype Argus X-8 kit to forensic casework. *Problems of Forensic Sciences*, 2008, 73, 53-64.

Adres do korespondencji:
Pracownia Hemogenetyki
Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej UJCM
ul. Grzegorzeczka 16
31-531 Kraków
e-mail: hemogenetyka@cm-uj.krakow.pl