

Grzegorz Kaczmarczyk¹, Danuta Piniewska¹, Barbara Opolska-Bogusz¹, Marek Sanak^{1,2}

Mutacja locus DYS389I wykryta podczas identyfikacji zaginionej osoby

A mutation within DYS389I locus in the missing person identification case

¹ Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego Pracownia Hemogenetyki; ul. Grzegórzecka 16; 31-531 Kraków

² Z II Katedry Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej; ul. Skawińska 8; 31-066 Kraków

W Pracowni Hemogenetyki Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium Medicum, przeprowadzono badanie identyfikacyjne zwłok mężczyzny nie rozpoznanych na podstawie oględzin. Materiałem porównawczym było DNA brata zaginionej osoby. Wykonane badanie 16 loci STR chromosomu Y człowieka ujawniło rozbieżność między zbadanymi haplotypami w zakresie 1 układu (DYS389I). Analiza 15 autosomalnych układów STR pozwoliła na potwierdzenie, że identyfikowany mężczyzna i brat zaginionego są rodzeństwem. Wynik badania haplotypów DNA chromosomu Y u braci zinterpretowano jako mutację w układzie DYS389I. Uwzględnienie tej mutacji w obliczeniach biostatystycznych nie zmniejszyło mocy identyfikacyjnej badania, ze względu na bardzo duże prawdopodobieństwo identyfikacji na podstawie badania loci autosomalnych oraz niewystępowanie ustalonych haplotypów STR Y wśród zbadanych prób populacyjnych.

An identification case is presented, in which a body of a deceased man was not recognized by his brother due to the corpse decomposition. The comparative material included DNA originating from the brother of the missing individual. In the Hemogenetics Laboratory of the Forensic Medicine Department, Jagiellonian University Medical College, bone tissue samples were genotyped for 16 STR loci on the chromosome Y and found concordant with the brother's reference sample, except a single locus DYS389I. Extended analysis for 15 autosomal STR loci confirmed that these men were brothers. Thus, a new mutation was encountered in DYS389I. When included in the biostatistical calculations, the mutation did not diminish the cumulative likelihood ratio of sibship

because of the very high likelihood based on autosomal loci analysis and nonexistence of the Y chromosome haplotypes in the known population databases.

WSTĘP

Podczas identyfikacji zwłok ludzkich prowadzonej w oparciu o badanie materiału genetycznego często napotykanym problemem jest niewielka ilość materiału biologicznego i jego silna degradacja. Dostępność materiału porównawczego pochodzącego od krewnych osoby identyfikowanej również bywa ograniczona. W przedstawionym przypadku identyfikacji szczątków mężczyzny jedyny dostępny materiał porównawczy pochodził od brata zaginionego. Przystępując do badań DNA rozpatrywano trzy możliwości ich przeprowadzenia: 1) w zakresie zestawu układów polimorficznych DNA genomu jądrowego wielu chromosomów, 2) na podstawie haplotypu układów polimorficznych chromosomu Y lub X, oraz 3) przez porównanie regionu hiperzmiennego DNA mitochondrialnego. Zaletą badania wielu niesprzężonych układów polimorficznych genomu jądrowego jest możliwość przeprowadzenia wiarygodnych obliczeń biostatystycznych prawdopodobieństwa identyfikacji [1, 2]. Ograniczeniem badania loci autosomalnych, w przypadku dostępności próbki porównawczej tylko od jednej osoby z rodzeństwa, jest brak możliwości jej wykluczenia, a także silna zależność prawdopodobieństwa identyfikacji od populacyjnych częstości wspólnych dla obu zbadanych osób alleli.

Ustalenie haplotypu chromosomu Y jest skuteczną metodą wykluczenia pokrewieństwa między osobą identyfikowaną a jego bratem [3], natomiast w przypadku braku różnic haplotypowych osób zbadanych, prawdopodobieństwo ich pokrewieństwa jest jedynie szacunkowe i oparte na empirycznej częstości tego haplotypu w bazach danych. Podobna możliwość, wykluczenia pokrewieństwa albo oszacowania prawdopodobieństwa identyfikacji na podstawie częstości empirycznych wariantu sekwencji DNA, dotyczy badania genomu mitochondrialnego w zakresie jego sekwencji zmiennej pętli D. Badanie to jest najmniej zależne od ograniczonej dostępności materiału genetycznego, a w przeciwieństwie do haplotypu chromosomu Y dowodzi wspólnego przodka płci żeńskiej między osobami badanymi, jednakże jest najbardziej czasochłonne.

W przedstawionym przypadku identyfikację zwłok podjęto początkowo w oparciu o badanie haplotypu chromosomu Y zakładając, że w przypadku pokrewieństwa bracia powinni mieć identyczny zestaw ojcowskich alleli w zakresie analizowanych loci. W konsekwencji uzyskanego wyniku, zakres analizy genetycznej rozszerzono do loci autosomalnych, co ostatecznie pozwoliło otrzymać rozstrzygający wynik.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badania były próbki tkanki pobrane w czasie sądowo-lekarskiej sekcji zwłok mężczyzny, którego zwłoki ujawniono 4 miesiące wcześniej: fragment kostny mostka i żebra oraz pojedynczy ząb – kieł. Materiałem porównawczym był wymaz z jamy ustnej pobrany od brata zaginionego mężczyzny.

DNA izolowano komercyjną metodą enzymatyczną, z użyciem minikolumn adsorpcyjnych (Sherlock AX, A&A Biotechnology, Polska). Fragmenty tkanek przygotowano poprzez dokładne mechaniczne usunięcie zabrudzeń zewnętrznych, zmycie wodą dejonizowaną, a następnie odwapnienie w roztworze zawierającym Tris/EDTA. DNA z wymazówki pobrane od brata zaginionego mężczyzny izolowano bez uprzedniego przygotowania, tą samą metodą.

Uzyskane DNA amplifikowano przy zastosowaniu zestawu AmpF ℓ STR Y-Filter™ (Applied Biosystems, USA), będącego multipleksem dla 16 loci typu krótkich powtórzeń wielokrotnych chromosomu Y człowieka (STR-Y), i poddano analizie na żelu poliakrylamidowym posługując się sekwenatorem ABI Prism 377 (Applied Biosystems, USA). Pomiar długości fragmentów DNA i genotypowanie wykonano programem komputerowym Genotyper v3.7 przyporządkowującym nazwy alleli na podstawie

porównania zamplifikowanych fragmentów z wzorcem fragmentów allelicznych zawartym w zestawie. Wynik tego badania przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Genotypy AmpF ℓ STR Y-Filter™ wykazane w zbadanych fragmentach kostnych i u brata zaginionego.

UKŁAD	NN fragm. mostka	NN żebro	Wymaz z j. ustnej
DYS456	16	16	16
DYS389I	14	14	13
DYS390	26	26	26
DYS389II	31	31	31
DYS458	17	17	17
DYS19	15	15	15
DYS385a/b	12-14	12-14	12-14
DYS393	13	13	13
DYS391	11	11	11
DYS439	10	10	10
DYS635	24	24	24
DYS392	11	11	11
Y GATA H4	12	12	12
DYS437	14	14	14
DYS438	12	12	12
DYS448	21	21	21

Tabela II. Genotypy AmpF ℓ STR Identifier wykazane w zbadanych fragmentach kostnych i u brata zaginionego.

UKŁAD	NN fragm. mostka	NN żebro	Wymaz z j.ustnej
D8S1179	12	12	12-13
D21S11	29	29	29-31.2
D7S820	11	11	10
CSF1PO	10-11	10-11	10-12
D3S1358	15-17	15-17	15-17
TH01	6-8	6-8	6
D13S317	12-14	12-14	12-14
D16S539	11	11	11-13
D2S1338	21-23	21-23	21-23
D19S433	14-15	14-15	14-15
vWA	18-19	18-19	18-19
TPOX	8	8	8
D18S51	16-21	16-21	16-21
D5S818	11-12	11-12	11-12
FGA	22-25	25	21
PŁEĆ	XY	XY	XY

Badanie 15 loci autosomalnych oraz genu AMELX/AMELY wykonano posługując się zestawem AmpF ℓ STR-IDENTIFILER (Applied Biosystems, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. Rozdział produktów amplifikacji i genotypowanie zostały wykonane w taki sam sposób, jak dla STR zlokalizowanych na chromosomie Y, a wyniki przedstawiono w tabeli II.

Obliczenia prawdopodobieństwa identyfikacji zaginionego mężczyzny jako brata osoby, od której pobrano materiał porównawczy, dokonano korzystając z programu komputerowego DNA-View wersja 27.12, posługując się częstościami alleli charakterystycznymi dla populacji polskiej.

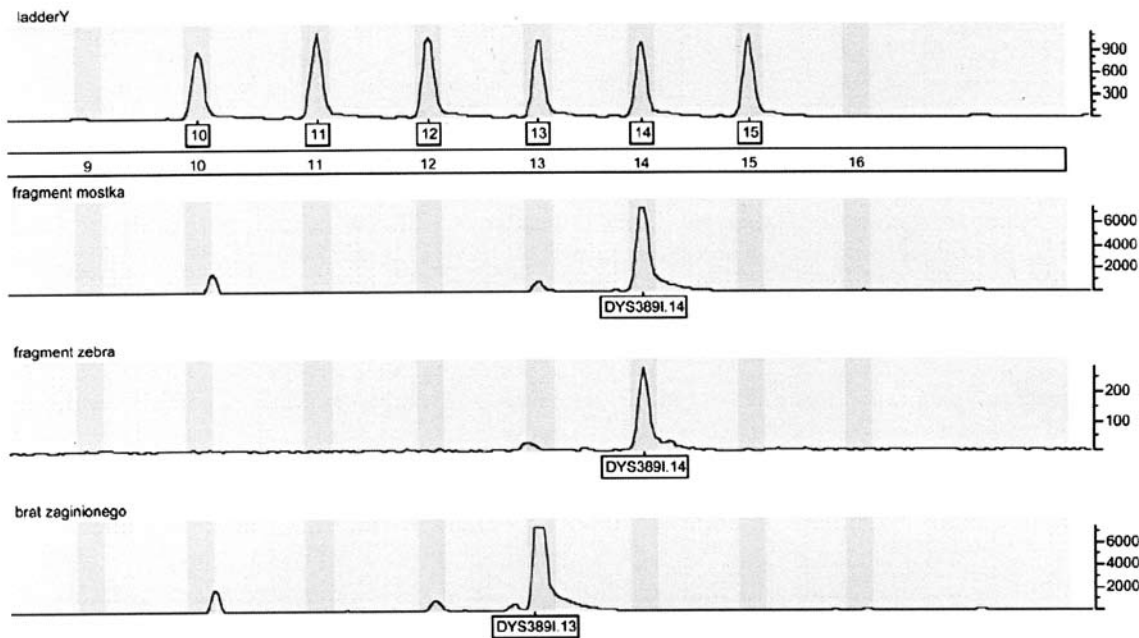
Występowanie stwierdzonych haplotypów chromosomu Y w populacji zbadano posługując się bazą populacyjną oferowaną przez producenta zestawu AmpF ℓ STR Y-FilerTM na stronie internetowej

Applied Biosystems: <http://www.appliedbiosystems.com/yfilerdatabase>.

WYNIKI

Analiza porównawcza cech genetycznych chromosomu Y wykazała w materiale wyizolowanym z fragmentu mostka i fragmentu żebra NN zwłok identyczny profil w zakresie wszystkich 16 zbadanych układów STR-Y. W materiale porównawczym pobranym od brata zaginionego mężczyzny również ustalono kompletny profil chromosomu Y w zakresie 16 badanych układów. Haplotyp ten różnił się jednak od profilu charakteryzującego materiał sekcyjny zwłok NN mężczyzny, bowiem w układzie DYS389I stwierdzono w materiale porównawczym allel 13, a w materiale sekcyjnym allel 14 (tab. I, ryc. 1).

Ryc. 1. Fluoregram układu DYS289I ilustrujący mutację u rodzeństwa. Górne dwa allele wykazano w materiale z tkanki kostnej, dolny pochodzi od brata zaginionego.



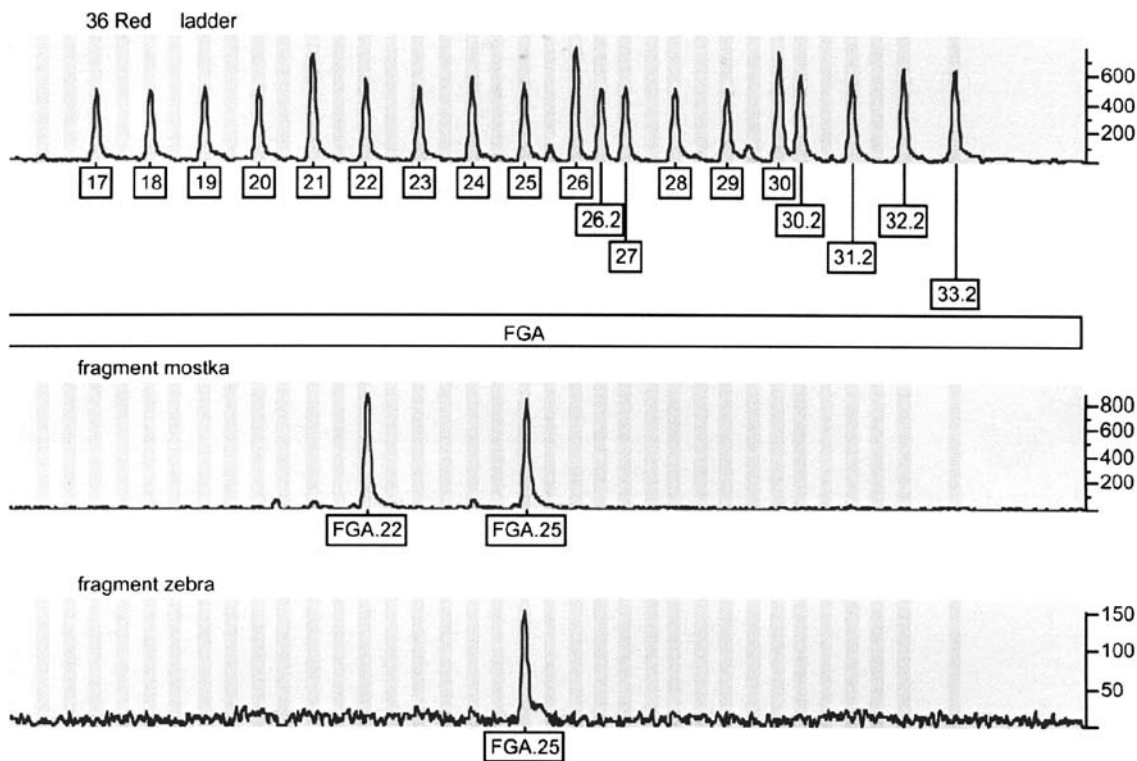
W zakresie 15 loci autosomalnych ustalono kompletny profil genetyczny identyfikowanego mężczyzny w materiale genetycznym izolowanym z kostnego fragmentu mostka. Wynik badania DNA tego mężczyzny uzyskany z pobranego fragmentu żebra był zgodny, z wyjątkiem układu FGA, w którym stwierdzono obecność tylko jednego z dwóch alleli wykazanych podczas analizy fragmentu mostka (ryc. 2). Badanie DNA izolowanego z zęba nie przyniosło wyników.

Analiza biostatystyczna w zakresie 15 loci autosomalnych typu STR wykazała bardzo duże prawdopodobieństwo, że identyfikowany na podstawie

materiału sekcyjnego mężczyzna i brat zaginionego są rodzeństwem biologicznym ($p=0,9999998$, indeks rodzeństwa $LR=5,614 \times 10^6$). Tak duże prawdopodobieństwo wynikało z obecności w 13 na 15 zbadanych układów STR wspólnych alleli.

Przy oszacowaniu wartości prawdopodobieństwa uzyskanej na podstawie oznaczenia haplotypu chromosomu Y uwzględniono opisane w układzie DYS389I mutacje pochodzenia ojcowskiego. Według metaanalizy dostępnych publikacji (<http://www.yhrd.org>) częstość tych mutacji wynosi średnio 0,182% (95% przedział ufności 0,094-0,318%). Obydwa stwierdzone haplotypy STR-Y nie były

Ryc. 2. Fluoregram układu FGA ilustruje brak amplifikacji jednego z alleli w bardziej zdegradowanym materiale genetycznym izolowanym z fragmentu żebra.



obserwowane wśród 1276 mężczyzn pochodzenia Europejskiego ani wśród 3561 ogółu mężczyzn genotypowanych i zestawionych w bazie producenta zestawu Y Filer. Również w badaniach własnych [4] nie obserwowano dotychczas tych haplotypów wśród 189 niespokrewnionych mężczyzn ani nie należały one do 7 typowych dla Polski klastrow haplotypowych, których częstość populacyjna przekracza 2%. W oszacowaniu ilorazu wiarygodności badania haplotypu Y, w odniesieniu do możliwości, że porównywane haplotypy należą do braci, posłużono się wyliczeniem zaproponowanym przez Brennera podczas wykładu Międzynarodowego Stowarzyszenia Genetyki Sądowej w 2004 roku (tekst dostępny w witrynie: <http://dna-view.com/PaperChallenge.htm>). Na podstawie łącznej liczby 3750 znanych haplotypów chromosomu Y konserwatywne oszacowanie częstości występowania któregośkolwiek ze zbadanych w tej sprawie wynosi 0,000267. Przy uwzględnieniu średniej częstości mutacji w zakresie układu DYS389I, obliczony iloraz wiarygodności, że haplotypy te należą do braci wynosi 6,825 (95% przedział ufności 3,525-11,925). Zatem łączny iloraz wiarygodności identyfikacji włók mężczyzny, jako zaginionego brata osiągnął wartość $LR=3,508 \times 10^7$, co przy 50% prawdopodobieństwie *a priori* wyraża się prawdopodobieństwem identyfikacji 99,9999972%, spełniając w zupełności

ogólnie stosowane kryteria praktycznie udowodnionej identyfikacji.

DYSKUSJA

W opisanym przypadku identyfikacji włók mężczyzny, mając równocześnie porównawczy materiał genetyczny brata zaginionego, oznaczenie haplotypu układów STR chromosomu Y wydawało się najszybszą metodą wykluczenia pokrewieństwa między osobami. Zbadane haplotypy chromosomu Y różniły się tylko w zakresie jednego układu DYS389I, przy czym różnica wielkości alleli wynosiła 1 powtórzenie, jak jest obserwowane w mutacjach. Układ DYS389I charakteryzuje się dość dużą częstością występowania mutacji – średnio 0,182%, zatem samo badanie STR-Y nie przyniosło rozstrzygnięcia co do pokrewieństwa badanych osób. Oznaczenie genotypów 15 autosomalnych loci typu STR wykazało z bardzo dużym prawdopodobieństwem, że zbadani mężczyźni są rodzeństwem. Łączna analiza biostatystyczna wyników badania identyfikacyjnego dowiodła, że mimo niezgodności w układzie DYS389I, po uwzględnieniu możliwości mutacji, badanie haplotypu chromosomu Y dodatkowo zwiększyło kilkakrotnie wiarygodność identyfikacji.

Mutacje w zakresie pojedynczych loci typu STR, w miarę coraz większej liczby układów objętych ge-

notypowaniem, stały się nierzadką obserwacją podczas badań dochodzenia spornego ojcostwa [3]. W badaniach identyfikacyjnych, przy ograniczonym dostępie do materiału genetycznego pochodzącego od krewnych osoby identyfikowanej, mutacja może istotnie zaważyć na wiarygodności uzyskanego wyniku. W przedstawionym przypadku założono, że różnica w zakresie 1 powtórzenia typu STR w układzie DYS389I między braćmi mogła być skutkiem mutacji ze względu na: 1) duży iloraz wiarygodności, że zbadane osoby to bracia, na podstawie analizy autosomalnych układów STR, 2) dalsze zwiększenie ilorazu wiarygodności po uwzględnieniu haplotypów Y, a przy założeniu wystąpienia mutacji, 3) typową dla mutacji zmianę wielkości allelu o 1 powtórzenie. Mutacja dotyczyła allelu o długości większej niż najczęstszy w populacji, podobnie jak w obu opisywanych w literaturze przypadkach [2, 3, 4] brak przynależności wykazanych haplotypów Y do często obserwowanych w Polsce grup haplotypowych, co zmniejsza prawdopodobieństwo ich przypadkowej zbieżności u badanych.

Przeprowadzone badanie identyfikacyjne wskazuje na korzyści płynące z łącznego stosowania technik genotypowania układów autosomalnych i sprzężonych z chromosomami płciowymi Y. Wydaje się również cenne dalsze gromadzenie indywidualnych haplotypów chromosomu Y, które przy braku lepszych metod statystycznych jest jedynym źródłem oszacowania częstości populacyjnej ich wystąpienia. Problem ten jest szczególnie istotny w kraju, w którym około 57% haplotypów chromosomu Y należy do jednej grupy haplotypowej [4, 5, 6]. Dodatkowo, przy identyfikacji genetycznej opartej na materiale sekcyjnym pobranym ze zwłok w zaawansowanym stanie rozkładu, istotne dla powodzenia badania jest poddanie analizie kilku tkanek. W opisanym przypadku najlepszym źródłem materiału genetycznego był fragment kostny mostka, gdzie ze względu na większą zawartość zbitą tkanki kostnej gnilne procesy rozpadu DNA przebiegały najwolniej. W DNA izolowanym z fragmentu żebra stwierdzono wypadnięcie pojedynczego allela w zakresie układu FGA o stosunkowo dużej wielkości produktu amplifikacji. Izolacja DNA z zęba, uzna-

wanego jako dobre źródło DNA przy zaawansowanym rozkładzie gnilnym zwłok, w przedstawionym przypadku nie przyniosła oczekiwanych wyników. Przyczyną mogło być pobranie pojedynczego zęba o niewielkiej komorze miazgi lub o obniżonej żywotności, które warunkują liczbę komórek dostępnych do badania w tej tkance.

PIŚMIENNICTWO

1. Sołtyśzewski I., Pepiński W., Spolnicka M., Kartasińska E., Konarzewska M., Janica J.: „Y-chromosomal haplotypes for the AmpFISTR Yfiler PCR Amplification Kit in a population sample from Central Poland.” *Forensic Sci. International*. Feb. 17, 2006.
2. Kurihara R., Yamamoto T., Uchihi R., Shi-Lin Li, Yoshimoto T., Ohtaki H., Kamiyama K., Katsumata Y.: “Mutations in 14 Y-STR loci among Japanese father-son haplotypes”. *Int. J. Legal Med.* 118:125-131, 2004.
3. Kayser M., Roewer L., Hedman M., Henke L., Henke J., Bauer S., Kruger C., Krawczak M., Nagy M., Dobosz T., Szibor R., de Knijff P., Stoneking M., Sajantila A.: “Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs”. *Am. J. Hum. Genet.* 66:1580-1588, 2000.
4. Opolska-Bogusz B., Kaczmarczyk G., Piniewska D., Sanak M.: „Cluster aggregation of Y chromosome haplotypes in a random sample of 189 Polish citizens studied with AmpFIYfiler Amplification Kit.” – poster presentation and abstract; *DNA in Forensic*; Innsbruck 2006.
5. Pawłowski R., Dettlaff-Kąkol A., Maciejewska A., Paszkowska R., Reichert M., Jezierski G.: „Genetyka populacyjna 9 loci typu Y-STR w populacji Polski Północnej”. *Arch. Med. Sadowej Kryminol.* 52(4):261-77, 2002.
6. Rębała K., Szczerkowska Z.: “Polish population study on Y chromosome haplotypes defined by 18 STR loci”. *Int J Legal Med.* 119: 303-305, 2005.