

Joanna Wysocka, Aneta Stasiewicz<sup>1</sup>, Krzysztof Rębała, Ewa Kapińska, Lidia Cybulska, Zofia Szczerkowska

## Analiza częstości mutacji w parach ojciec-syn w wybranych markerach Y-STR

### Analysis of mutations in father-son pairs within selected Y-STR loci

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: dr hab. med. Z. Jankowski

<sup>1</sup> Z Samodzielnej Pracowni Embriologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: dr hab. M. Cichorek

Określono mutacyjność markerów loci chromosomu Y w 200 parach ojciec-syn z terenu Polski północnej, w których ojcostwo potwierdzono uprzednio w analizach autosomalnych systemów STR ( $PI \geq 100\ 000$ ) badając standardowo profil genetyczny matki, dziecka i domniemanego ojca. Zakres badań obejmował 18 markerów typu Y-STR. W przeanalizowanej grupie zaobserwowano 11 mutacji. Pięć z nich miało charakter insercyjny, natomiast pozostałe sześć to mutacje delecyjne. Większość niezgodności wynikała ze zmiany liczby pojedynczego powtórzenia jednostki repetytywnej. W locus DYS385, w dwóch parach ojciec/syn, obserwowano utratę dwóch jednostek repetytywnych. Całkowita częstość mutacji dla 18-tu markerów chromosomu Y wyniosła 0,0031. W loci Y-STR 200-tu zbadanych par ojciec/syn nie zaobserwowano znaczących różnic w wartości częstości mutacji z danymi pochodzącymi ze światowej bazy danych YHRD.

The objective of the study was to examine the mutation rates of Y-chromosomal STR from father-son pairs. The paternity in these cases was confirmed previously with the use of autosomal STR system performing standard analyses of genetic profiles of the mother, child and putative father ( $PI \geq 100\ 000$ ). We examined 200 father-son sample pairs from Northern Poland using the Y-STR 18-plex. We identified eleven mutations. Five mutations resulted in the gain of a repeat in the sons' chromosome and six resulted in a loss of a repeat. All the samples resulted in single repeat mutations from one sample, which contained a two repeat

loss at DYS385. The overall average mutation rate estimate was 0.0031. There was no significant difference in the mutation rate between Y-STR loci of the 200 tested father-son pairs and the YHRD base.

Słowa kluczowe:

Y-STR, częstości mutacji,  
ustalenie ojcostwa

Key words:

Y-STR, mutation rates,  
paternity testing

## WSTĘP

Określenie polimorficznych sekwencji DNA stało się w ostatnich latach rutynową praktyką laboratoriów genetyczno-sądowych. Wykorzystuje się je w szerokim zakresie zarówno w badaniu śladów biologicznych i identyfikacji osobniczej, jak również w ustalaniu pokrewieństwa, w tym ojcostwa.

Początkowo w badaniach znalazły zastosowanie markery chromosomów autosomalnych, zwłaszcza krótkie repetytywne powtórzenia nukleotydowe typu STR. Stało się tak z uwagi na powszechność ich występowania w genomie ludzkim i wysoki polimorfizm.

W ostatnich latach obiektem dużego zainteresowania genetyków sądowych stały się polimorficzne markery płci, a zwłaszcza chromosomu Y. Stanowi on zaledwie 2% genomu człowieka, a większa jego część (95%) nie podlega rekombinacji. Posiada jednak szczególne właściwości –

charakterystyczny jest dla osobników płci męskiej i dziedziczony jest w linii ojciec-syn. Ta unikalna specyfika chromosomu Y sprawia, że oznaczenie jego markerów jest niezwykle przydatne w sprawach dotyczących m.in. dochodzenia ojcostwa (gdy dziecko jest płci męskiej).

W każdym przypadku badań DNA w ustalaniu ojcostwa, w którym obserwuje się zgodność profili DNA domniemanego ojca i dziecka, niezbędna jest analiza statystyczna otrzymanych wyników. W rachunku tym brana jest pod uwagę częstość występowania w populacji układu cech odziedziczonych po ojcu, z uwzględnieniem ewentualnych mutacji, których obecność w znaczący sposób obniża indeks ojcostwa, a tym samym, prawdopodobieństwo ojcostwa. Najprostszym sposobem ich analizy jest bezpośrednia detekcja przez genotypowanie. Z badań J. C. Roach wynika, że średni stopień mutacji u człowieka wynosi  $\sim 1,1 \times 10^{-8}$  na zasadę w haploidalnym genomie [1], zaś średnia częstość mutacji dla wszystkich 17 Y-STR loci (zestaw AmpFISTRy-filer f-my Applied Biosystems) osiąga wartość 0,0025 [2].

W niniejszych badaniach podjęto ocenę częstości mutacji dla 18-tu Y-STR loci znajdujących coraz częstsze zastosowanie w genetyce sądowej [3].

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowił DNA wyizolowany z krwi lub wymazów z jamy ustnej pochodzący od 200-tu par ojciec-syn z terenu Polski północnej, w których ojcostwo potwierdzono analizą autosomalnych systemów STR ( $PI >= 100\ 000$ ) – archiwum Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej GUMed).

Zakres badań obejmował Y-STR 18-plex: DYS19, DYS385a/b, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS388, DYS426, DYS437, DYS348, DYS439, DYS460, GATA H4.1, YCA II. Reakcję PCR przeprowadzono w termocyclerze Mastercycler Gradient (f-my Eppendorf) w całkowitej objętości 5  $\mu$ l, w warunkach opisanych przez K. Rębałę [3]. Produkty amplifikacji rozdzielano drogą elektroforezy kapilarnej przy użyciu analizatora genetycznego 3130 ABI Prism (Applied Biosystems) i genetypowano stosując program GeneMapper Id v.3.2 software.

## WYNIKI I DISKUSJA

Analizie poddano 18 markerów Y-STR: DYS19, DYS385a/b, DYS383I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS426, DYS437, DYS438, DYS439, DYS460, GATA H4.1, YCA II, DYS388. W tym zakresie mieści się 9 systemów tworzących tzw. „minimalny haplotyp”. Przyjęte nazewnictwo alleli było zgodne z zaleceniami ISFG.

Wśród poddanych badaniom osób w obrębie 18-tu Y-STR loci zaobserwowano 11 niezgodności w parach ojciec-syn. Pięć z nich wynikało z pojawienia się dodatkowej jednostki repetytywnej u dziecka (insercja), sześć pozostałych było wynikiem jej utraty (delecja). Podczas analizy badanych próbek określono profil DNA zawierający dodatkowy allel. W locus DYS438 u ojca zaobserwowano duplikację, obecność dwóch alleli 9 i 11, podczas gdy u dziecka w tym samym markerze genetycznym pojawił się tylko allel 11 (tabela I).

*Tabela I. Rodzaje zaobserwowanych mutacji w 200-tu parach ojciec-syn w 18-tu Y-STR loci.*

*Table I. Types of mutations observed in 200 father-son pairs in 18 Y-STR loci.*

Lp.	Locus Locus	Allel ojca Paternal allele	Allel syna Filial allele	Rodzaj mutacji Type of mutation
1	DYS39 II	30	31	insercja / insertion
2	DYS 19	15	16	insercja / insertion
3	DYS 390	25	26	insercja / insertion
4	DYS 389 I	13	14	insercja / insertion
5	DYS 390	26	27	insercja / insertion
6	DYS 439	13	12	delecja / deletion
7	DYS 385 a/b	14,17	12,17	delecja / deletion
8	DYS 385 a/b	11,14	11,12	delecja / deletion
9	DYS 385 a/b	14,16	14,15	delecja / deletion
10	DYS 460	11	10	delecja / deletion
11	DYS 438	9,11	11	duplikacja / duplication

Większość niezgodności w parach ojciec-syn, które odnotowano przy analizie markerów Y-STR było konsekwencją zmiany długości allele'a o pojedynczą jednostkę repetytywną (tabela II). W jednym przypadku zaobserwowano obecność dodatkowej mutacji w obrębie markerów autosomalnych.

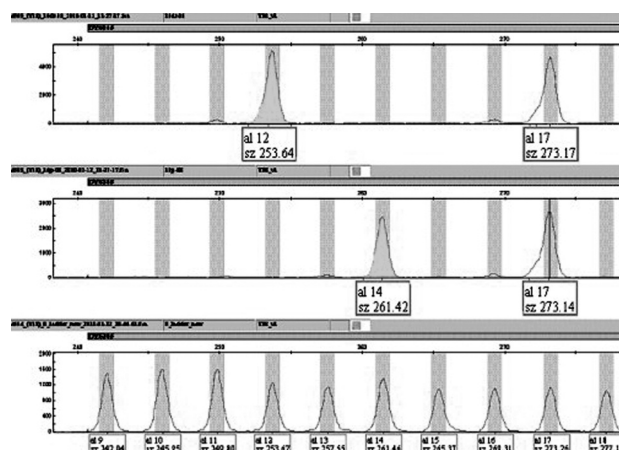
Tabela II. Liczba i częstość mutacji w 18-tu Y-STR loci wykazanych w analizowanej populacji Polski północnej.

Table II. The number and frequency of mutations in 18 Y-STR loci observed in the population of Northern Poland.

Locus Locus	Liczba mutacji Number of mutations	Mejozy Meioses	Częstość mutacji Frequency of mutations
DYS 391	0	200	---
DYS 389 I	1	200	0,005
DYS 437	0	200	---
DYS 439	1	200	0,005
DYS 389 II	1	200	0,005
DYS 426	0	200	---
DYS 393	0	200	---
YCA II	0	200	---
DYS 390	2	200	0,010
DYS 385 a/b	3	200	0,015
DYS 460	1	200	0,005
GATA H4.1	0	200	---
DYS 388	0	200	---
DYS 19	1	200	0,005
DYS 438	1	200	0,005
DYS 392	0	200	---
<b>Całkowita częstość mutacji</b> Total frequency of mutations	11	200	0,0031

Najwyższa obliczona wartość częstości mutacji wynosiła 0,015 i wystąpiła w locus *DYS385*, który został uznany za najbardziej polimorficzny marker badanego multipleksu [3]. Ten sam parametr w oparciu o analizę znacznie większej populacji (aż 25'306 par mężczyzn) wyniósł zaledwie 0,00213 [4].

Na podstawie przeprowadzonych badań zauważono, że jedynie w przypadku mutacji delecyjnej, zmiany, które zaszły dotyczyły utraty dwóch jednostek repetytywnych. W wysoce polimorficznym markerze *DYS 385 a/b* zaobserwowano 3 niezgodności w parach ojciec-syn, w tym dwie, które dotyczyły utraty dwóch jednostek repetytywnych (ryc. 1).



Ryc. 1. Elektroforegram przedstawiający zmianę długości allele'a o dwie jednostki repetytywne w locus *DYS385* (panel górny – syn, panel środkowy – ojciec).

Fig. 1. Electropherogram presenting a change in the length of the allele, resulting in a shift from allele 14 to 12, in *DYS438* locus (upper panel – son, middle panel – father).

W sześciu markerach: *DYS389 I*, *DYS439*, *DYS389 II*, *DYS460*, *DYS19* oraz *DYS438* wystąpiły pojedyncze mutacje, a ich częstość dla wszystkich wynosiła 0,005.

Częstości mutacji wykazane w przeprowadzonych badaniach nie odbiegają w znaczący sposób od wyników przeanalizowanych tysięcy par ojciec-syn z obszaru całego świata. Niewielkie rozbieżności zaobserwowane w częstościach mutacji dla

poszczególnych markerów chromosomu Y badanej grupy 200 par ojciec-syn wynikają z różnicy pomiędzy liczebnością zbadanych mejoz. Obliczona całkowita częstość mutacji dla badanego multiplexu Y-STR wyniosła 0,0031. Zbliżoną średnią wartość mutacji zaobserwowano dla 17 loci Y-STR (Y-filer, Applied Biosystems), analizując dwukrotnie większą grupę osób [5].

W tabeli III przedstawiono uzyskane wyniki wraz z danymi występującymi w międzynarodowej bazie danych YHRD i z publikacji naukowych [2, 4, 6, 7].

Uzyskane wyniki badań i dane z innych populacji wskazują, że mutacje w markerach Y-STR pojawiają się niezwykle rzadko, stąd ich wysoka przydatność w genetyce sądowej. Mutacje w markerach Y-STR występują znacznie rzadziej niż w loci autosomalnych [8].

Zmienność mutacyjna jest podstawą procesów ewolucyjnych. Dzięki niej powstają nowe allele, a tym samym wzrasta polimorficzność genu, przyczyniając się do zwiększenia jego informatywności. Odkąd istotne zróżnicowanie haplotypów Y-STR pomiędzy populacjami, jak i wewnątrz nich znalazło szerokie zastosowanie w badaniach filogenetycznych, ewolucyjnych, a przede wszystkim w medycynie sądowej w ustalaniu pokrewieństwa, w tym ojcostwa, zestaw analizowanych i dobrze poznanych markerów sukcesywnie rośnie.

Wykazane w przedstawionej pracy właściwości mutacyjne loci Y-STR mają znaczący wpływ na interpretację wyników, stąd znajomość współczynnika mutacji dla poszczególnych markerów genetycznych wydaje się być niezbędną do prawidłowego opiniowania w sprawach sądowych. Wiedza ta jest konieczna szczególnie w przypadkach analizy pokrewieństwa, gdy dostępny jest wyłącznie materiał porównawczy od osób niespokrewnionych w pierwszej linii [9].

*Tabela III. Tabela przedstawiająca obliczone częstości mutacji dla 200 par ojciec-syn wraz z danymi występującymi w międzynarodowej bazie danych YHRD i z publikacji naukowych.*

*Table III. Mutation rates for 200 father-son pairs with the data from YHRD database scientific papers.*

<b>YHRD/ dane z literatury + badana próbka 200 par ojciec/syn</b> YHRD/data from literature + investigated sample of 200 father-son pairs			
<b>Locus</b> Locus	<b>Mutacje</b> Mutations	<b>Mejozy</b> Meioses	<b>Częstość mutacji</b> Frequency of mutations
DYS 391	38	14`821	0,00256
DYS 389 I	35	13`674	0,00256
DYS 437	12	9`987	0,00120
DYS 439	52	9`982	0,00520
DYS 389 II	50	13`645	0,00366
DYS 438	4	10`008	0,00039
DYS 426	0	1`258	---
DYS 393	14	13`539	0,00103
YCAII a/b	0	1`058	---
DYS 390	33	14`947	0,00220
DYS 385 a/b	57	25`506	0,00223
DYS 460	3	1`310	0,00229
GATA H4.1	18	7`595	0,00236
DYS 388	0	1`246	---
DYS 19	36	15`425	0,00233
DYS 392	6	14`753	0,00040

## PIŚMIENNICTWO

1. Roach J. C., Glusman G., Smit A. F. A i wsp.: Analysis of Genetic Inheritance in a Family Quartet by Whole-Genome Sequencing. *Science*, 2010, 328: 636-639.

2. Goedbloed M. i wsp.: Comprehensive mutation of 17 Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms included in the AmpFISTR®Yfiler® PCR amplification kit; *International Journal of Legal Medicine*. 2009, 6: 471-482.

3. Rębała K., Szczerkowska Z.: Polish population study on Y chromosome haplotypes defined by 18 STR loci, *International Journal of Legal Medicine*. 2005, 119: 303-305.

4. [www.yhrd.org](http://www.yhrd.org)

5. Roewer L.: Jaki ojciec taki syn, *Genetyka*

i prawo, *Kwartalnik Naukowy Zakładu Genetyki Molekularnej i Sądowej*. Bydgoszcz 2009, 2: 4-5.

6. Hadley K. i wsp.: Non-paternity and locus Specific Mutation Rates of 36 Y Chromosome STRs, *American Society of Human Genetics*, 2004.

7. Pepiński W. i wsp.: Population genetics of Y-chromosome STRs in a population of Podlasie, northeastern Poland, *Forensic Sci. Int.* 2004, 144: 77-82.

8. Decker A. i wsp.: Analysis of mutation in father-son pairs with 17 Y-STR loci, *Forensic Sci. Int.: Genetics*. 2008, 2: 31-35.

9. Woźniak M., Skowron A., Bednarek J.: Ocena polimorfizmu loci STR chromosomu Y: DYS 19, DYS 389I, DYS 389II i DYS 390 w populacji Kujawsko-Pomorskiej, *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 2001, 3: 239-141.

Adres do korespondencji:

Dr n. med. Joanna Wysocka

[wysocka@gumed.edu.pl](mailto:wysocka@gumed.edu.pl)

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

ul. Dębowa 23

80-204 Gdańsk