

**Marta Czarnogórska¹, Marek Sanak², Danuta Piniewska¹, Nina Kochmańska¹,
Agnieszka Stawowiak¹, Barbara Opolska-Bogusz¹**

Rzadki wariant alleliczny D19S433*7 w badaniu spornego ojcostwa z mutacją

A rare D19S433*7 variant in the paternity case with mutation

¹ Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej UJ CM
Kierownik: prof. dr hab. n. med. M. Kłys

² Z Zakładu Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej, II Katedry Chorób Wewnętrznych
Kierownik: prof. dr hab. med. M. Sanak

Podczas rutynowego badania spornego ojcostwa, przy użyciu zestawu autosomalnych loci typu STR-AmpFłSTR Identifiler stwierdzono brak segregacji allele ojcowskiego w układzie D21S11 oraz pozadrabinowy allele w układzie D19S433. Sugerowało to obecność mutacji w locus D21S11, ponieważ w pozostałych 14 układach dziecko dziedziczyło allele od domniemanego ojca. Celem uzyskania rekomendowanej wartości szansy ojcostwa (PI), poszerzono zakres badań o dodatkowe autosomalne markery genetyczne (Penta D i E) oraz haplotyp chromosomu Y, nie obserwując dalszych wykluczeń ojcostwa. Dodatkowo w badaniu zastosowano nowy zestaw multiplexowy PowerPlex ESI 17. Porównanie wspólnych dla PowerPlex ESI 17 i AmpFłSTR Identifiler układów potwierdziło obecność mutacji w układzie D21S11, natomiast w locus D19S433 u dziecka i domniemanego ojca potwierdzono obecność rzadkiego wariantu allelicznego D19S433*7. Wariant D19S433*7 nie był dotychczas opisany w polskiej populacji. Przewagą zestawu multiplexowego PowerPlex ESI 17, poza rozszerzeniem liczby loci o 6 spoza zakresu multiplexu Identifiler, jest większa liczba wariantów allelicznych we wzorcu. Dokładna analiza każdego z sygnałów fluorescencji, nawet jeśli wykraczają poza zakres wielkości zdefiniowany dla układu, powinna budzić podejrzenie obecności rzadkich wariantów genetycznych.

During a routine paternity casework performed with an automated genotyping using the AmpFISTR

Identifiler kit, a lack of paternal allele segregation in D21S11 and off-ladder allele in D19S433 locus was observed. This raised suspicion of mutation because the other systems showed transmission of putative father's alleles to the child. To achieve the recommended value of paternity index (PI), the range of analysis was extended by additional autosomal loci (Penta D and Penta E) and haplotype of the chromosome Y. No further exclusions were observed. Additionally, a new PowerPlex ESI 17 kit was used. By comparison, the results common for both the multiplex kits confirmed the presence of the mutation in D21S11 locus. In locus D19S433, a rare variant D19S433*7 allele was evidenced in the putative father and the child. This variant allele was included in size range of allelic ladder in the PowerPlex ESI 17 kit, but not in AmpFłSTR Identifiler kit. The variant D19S433*7 allele was not reported in the Polish population before. The PowerPlex ESI 17 genotyping kit has two advantages, i.e. introduction of 6 loci not included in the Identifiler kit, and extended ranges of allelic ladders. It seems that a careful scrutiny of fluorescent signals following electrophoretic separation is essential to detect rare variant alleles and to avoid misinterpretation of the results.

Słowa kluczowe: wariant D19S433*7, dochodzenie spornego ojcostwa, mutacja
Key words: variant D19S433*7 allele, paternity case, mutation

WSTĘP

Badanie polimorfizmu DNA genomowego typu STR jest powszechnie stosowane przy ustalaniu spornego ojcostwa. Komercyjnie dostępne zestawy odczynnikowe pozwalają na ustalenie genotypu z wykorzystaniem multipleksowej reakcji PCR, dla silnie dyskryminujących loci człowieka na autosomach i chromosomach płci [1, 2, 3, 4]. Zgodnie z aktualnymi (2009) wytycznymi Komisji Genetyki Sądowej Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii szansa ojcostwa (ang. paternity index, PI) musi wynosić co najmniej 1 000 000, aby wynik badania można uznać za potwierdzający biologiczne ojcostwo. Wykluczenie ojcostwa powinno zostać wykazane, na podstawie braku segregacji wariantów genetycznych między domniemanym ojcem a dzieckiem, w co najmniej czterech układach polimorficznych. W przypadku uzyskania mniejszej szansy ojcostwa, co jest często spowodowane brakiem materiału biologicznego pochodzącego od matki dziecka, albo brakiem segregacji ojcowskiego wariantu allelicznego spowodowanym mutacją w pojedynczym układzie polimorficznym, zachodzi konieczność poszerzenia zakresu badań o dodatkowe markery genetyczne, ponad minimalną liczbę 10-15 zbadanych loci [5, 6]. Stwierdzenie braku segregacji wariantu allelicznego między ojcem a dzieckiem w jednym locus typu STR jest zjawiskiem rzadkim. Przy założeniu średniej częstości mutacji wariantów polimorficznych typu STR 1:400 mejoz oraz badań spornego ojcostwa wykonywanych w zakresie 15 układów STR, mutacje w jednym z układów obserwowane są z częstością około 1 na 30 zbadanych spraw, w których potwierdzono ojcostwo biologiczne.

Nowością w genetyce sądowej są loci typu mini-STR, dla których długości produktów amplifikacji DNA nie przekraczają 200 par zasad [7, 8]. Ich podstawowym zastosowaniem jest badanie zdegradowanego materiału genetycznego, którego amplifikacja kończy się niepowodzeniem, jeżeli oczekiwane jej produkty są większe od 150 par zasad. Jednym z najnowszych zestawów do badań polimorfizmu DNA, w którym połączono jedenaście markerów genetycznych typu mini-STR oraz pięć nowych loci STR rekomendowanych przez ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes), jest zestaw PowerPlex ESI 17 firmy Promega [9].

W Pracowni Hemogenetyki Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie badania

spornego ojcostwa wykonywane są rutynowo przy użyciu zestawu multipleksowego STR-AmpF Φ STR Identifiler (Applied Biosystems, USA). W przedstawionym przypadku, podczas automatycznej analizy profilu genetycznego pozwanego mężczyzny oraz dziecka (chłopca) i jego matki, stwierdzono pozadrabinowy allel D19S433*7 oraz mutację pochodzenia ojcowskiego w układzie D21S11. Konieczność poszerzenia badań o dodatkowe markery genetyczne oraz potwierdzenia wyników uzyskanych zestawem Identifiler skłoniła do wykonania, poza dwoma monopleksami (Penta D i Penta E), badania zestawem PowerPlex ESI 17 oraz Y-Filer.

MATERIAŁ I METODY

Do badań wykorzystano materiał w postaci wymazów ze śluzówki policzka jamy ustnej od domniemanego ojca, matki i dziecka zgłaszających się do Zakładu Medycyny Sądowej w celu ustalenia spornego ojcostwa (próbki 348, 349, 350/2009). Genomowe DNA izolowano przy pomocy zestawu Sherlock AX (A&A Biotechnology, Gdańsk) metodą ekstrakcji enzymatycznej z użyciem kolumn jonowymiennych. Badanie w zakresie multipleksowego DNA-STR oraz polimorfizmu loci STR ludzkiego chromosomu Y wykonano wykorzystując amplifikację fragmentów DNA z użyciem odczynników AmpF Φ STR Identifiler oraz AmpFISTR Y-filer firmy Applied Biosystems zgodnie z zaleceniem producenta. Amplifikację monopleksu PowerPlex[®] 16 Monoplex System Penta D i Penta E oraz multipleksu PowerPlex[®] ESI 17 System przeprowadzono posługując się odczynnikami firmy Promega.

Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji przeprowadzono z wykorzystaniem automatycznego sekwenatora ABI Prism 377 (Applied Biosystems, USA) na 5% poliakrylamidowym żelu denaturującym (Amresco, USA), stosując odpowiednie macierze kompensacji kolorów i wewnętrzne standardy wielkości DNA: LIZ-500 i CC5 ILS 500, stosownie do analizowanego zestawu odczynnikowego. 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 drabinami allelicznymi. Prawdopodobieństwo ojcostwa obliczono przy pomocy programu DNA-VIEW wersja 29.03 na podstawie częstości allelicznych dla populacji polskiej, z uwzględnieniem zaistniałej mutacji. Porównanie częstości haplotypu DNA

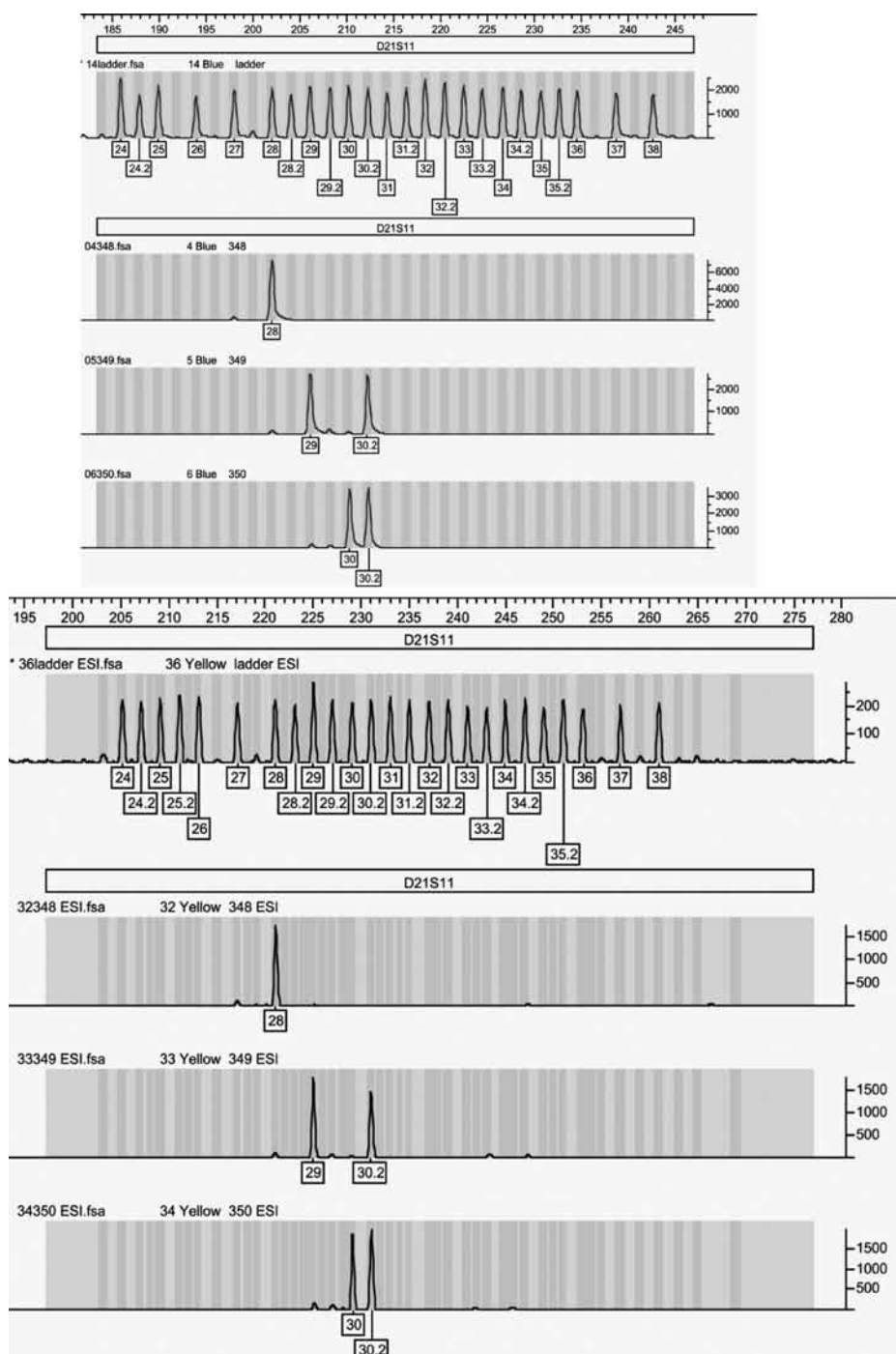
chromosomu Y człowieka dokonano posługując się bazą populacyjną dostarczoną przez producenta zestawu AmpF ℓ STR $^{\circledR}$ Y-filer dostępną na stronie internetowej www.appliedbiosystems.com/yfilerdatabase.

WYNIKI

Przy użyciu multipleksu AmpF ℓ STR Identifier stwierdzono u dziecka w układzie D21S11 (ryc. 1, genotyp 29-30.2) brak segregacji allela

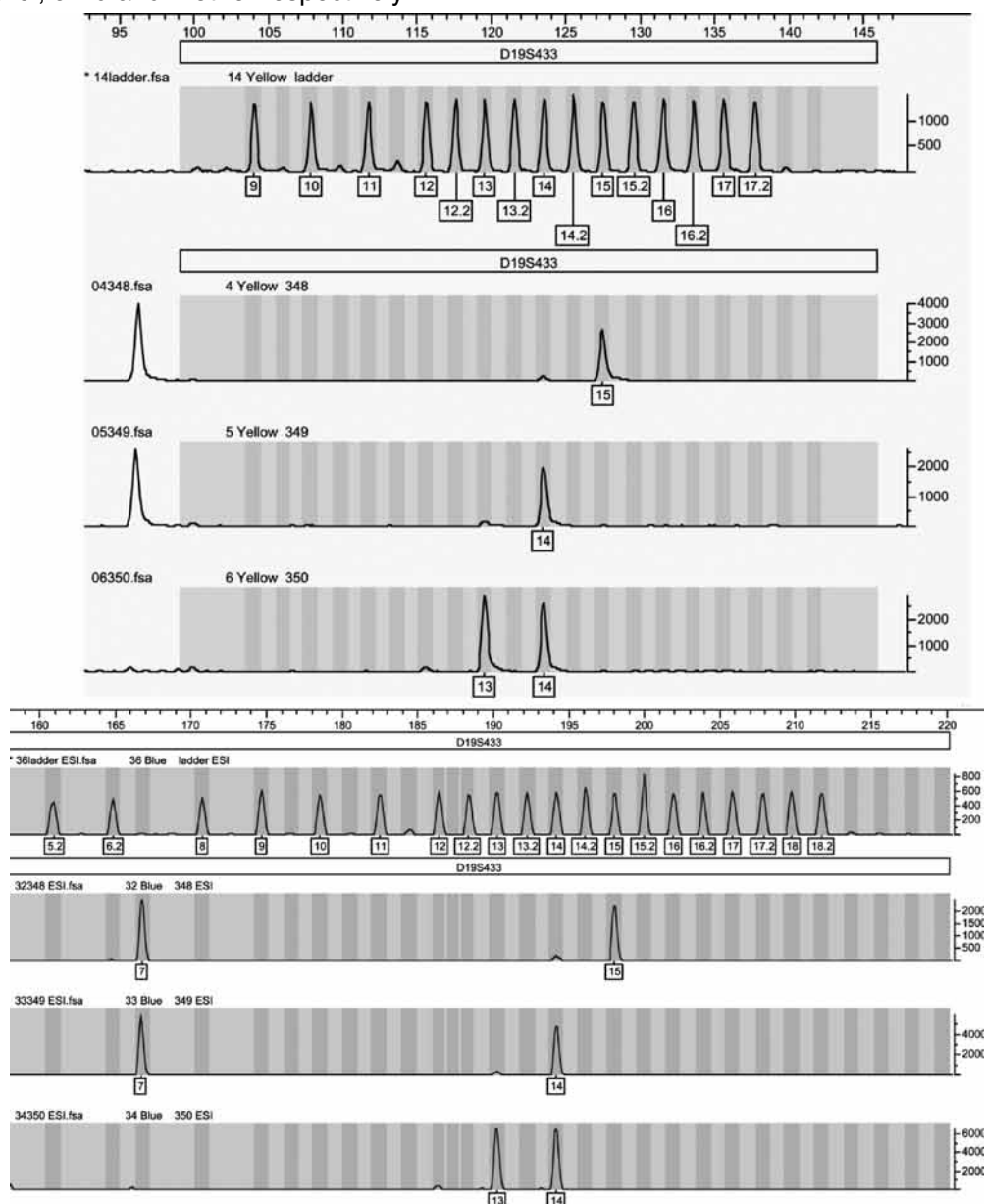
Ryc. 1. Fluoregram układu D21S11 wraz z drabiną alleli w badaniu ojcostwa przy użyciu zestawu AmpF ℓ STR Identifier (u góry) i PowerPlex $^{\circledR}$ ESI 17 (u dołu). Próbki 348, 349, 350 odpowiadają domniemanemu ojcu, dziecku i matce.

Fig. 1. Fluoregram of D21S11 locus with the allelic ladder in the paternity casework using AmpF ℓ STR Identifier (upper panel) and PowerPlex $^{\circledR}$ ESI 17 (lower panel) kit. Samples 348, 349, 350 correspond to the putative father, child and mother, respectively.



Ryc. 2. Fluoregram układu D19S433 wraz z drabiną alleli w badaniu ojcostwa przy użyciu zestawu AmpF ℓ STR Identifiler (u góry) i PowerPlex $^{\circledR}$ ESI 17 (u dołu). Próbki 348, 349, 350 odpowiadają domniemanemu ojcu, dziecku i matce.

Fig. 2. Fluoregram of D19S433 locus with the allelic ladder in the paternity casework using AmpF ℓ STR Identifiler (upper panel) and PowerPlex $^{\circledR}$ ESI 17 (lower panel) kit. Samples 348, 349, 350 correspond to the putative father, child and mother respectively.



ojcowskiego (genotyp 28-28). W pozostałych 14 układach dziecko dziedziczyło allele ojcowskie, a we wszystkich 15 zbadanych obecne były allele matczyne. Dodatkowo, u dziecka i pozwanego w układzie D19S433 zaobserwowano obecność pozadrabinowego allele (D19S433*7) o długości 96,3 nukleotydów. Łączna szansa ojcostwa, na podstawie zbadanych 15 loci wyniosła 33 325,9. Częstość występowania mutacji pochodzenia ojcowskiego dla locus D21S11

szacowana jest na 0,15% [<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/mutation.htm>]. Poszerzenie zakresu badań o kolejne dwa układy (Penta D i Penta E) wykazało u dziecka segregację allele ojcowskich, natomiast łączna szansa ojcostwa zwiększyła się do 416 697,1. Obliczone prawdopodobieństwo ojcostwa po przeanalizowaniu 17 markerów genetycznych, przy założeniu obecności jednej mutacji wynosiło 99,99976%, co było niedostateczne dla wykazania ojcostwa

pozwanego mężczyzny. Badane dziecko było płci męskiej, zatem wykonano analizę loci STR chromosomu Y. Ustalony haplotyp STR-Y były identyczne w zakresie wszystkich 16 zbadanych układów u dziecka i domniemanego ojca. Ustalony haplotyp był obserwowany raz na 4114 osób pochodzenia europejskiego, których profile zawarte są w bazie danych producenta zestawu. Po uwzględnieniu tych wyników w obliczeniach biostatystycznych, prawdopodobieństwo ojcostwa wzrosło do 99,99999988%, przy szansie ojcostwa $PI=8,57 \times 10^8$, co potwierdziło biologiczne ojcostwo pozwanego. Przy zastosowaniu nowego zestawu PowerPlex ESI 17, w którym 11 układów zawartych jest również w zestawie AmpF λ STR Identifiler, w dodatkowych 6 układach stwierdzono u dziecka segregację alleli ojcowskich. Porównanie wspólnych dla PowerPlex ESI 17 i AmpF λ STR Identifiler wyników potwierdziło obecność mutacji w układzie D21S11 oraz występowanie u dziecka i domniemanego ojca rzadkiego allela D19S433*7 o długości 166,8 nukleotydów.

W zestawie AmpF λ STR Identifiler brak odpowiedniego wzorca dla D19S433*7 oraz węższy zakres możliwych wariantów genetycznych identyfikowanych programem Genotyper (od 9 do 17.2 powtórzeń) spowodował, że zaistniała konieczność zweryfikowania uzyskanych wyników i potwierdzenia obecności rzadkiego allela D19S433*7. Dlatego też zastosowano zestaw PowerPlex ESI 17, w którym zakres identyfikowanych wariantów D19S433 jest szerszy (od 5.2 do 18.2 powtórzeń). Obliczone ostatecznie prawdopodobieństwo ojcostwa wyniosło 99,999999999999%, przy szansie ojcostwa $PI=1,18 \times 10^{13}$, co pozwoliło na wydanie opinii o udowodnionym ojcostwie biologicznym mężczyzny w stosunku do badanego dziecka.

DYSKUSJA

W genetyce sądowo-lekarskiej kryteria identyfikacji w ostatnich latach uległy znacznemu zaostrzeniu. Ma to związek ze zwiększeniem liczby badanych układów polimorficznych, i związanym z tym oczekiwaniem wyższych prawdopodobieństw identyfikacji.

Mutacje alleli STR są stałym, choć niezbyt częstym zjawiskiem biologicznym. Ich występowanie różni się w zależności od markera genetycznego i wykazuje związek z określonymi wariantami locus, liczbą powtórzeń motywu, jak również jest większa w przypadku mejoz

ojcowskich [3, 10]. Większa częstość mutacji ojcowskich niż matczynej tłumaczona jest większą liczbą podziałów komórkowych podczas powstawania gamety męskiej. Różnice częstości mutacji między mężczyznami a kobietami szacuje się, że pozostają w proporcji jak 17:1 [10].

Locus D19S433 zlokalizowane jest w obrębie chromosomu 19 (19q12-13.1; 35.109 Mb) i zawiera czteronukleotydową jednostkę repetytywną (AAGG) [http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/str_d19s.htm]. Wzorzec alleli dla mikrosatelitarnego układu D19S433 jest różny w zależności od stosowanego zestawu markerów genetycznych typu STR. W zestawie Identifiler drabina alleli dla locus D19S433 składa się z 15 fragmentów DNA o długości od 106 do 140 nukleotydów, natomiast w zestawie PowerPlex ESI 17 z 20 fragmentów DNA o długości od 163 do 215 nukleotydów. W bazie NIST (ang. National Institute of Standards and Technology) [http://www.cstl.nist.gov/strbase/var_D19S433.htm] wariant D19S433*7 został opisany sześciokrotnie, z czego w zaledwie dwóch przypadkach podano oszacowanie jego częstości. Częstość populacyjna tego wariantu, podana przez Angelę Withrow wynosi 2 na 8844 przebadanych osób. Dotychczas nie ustalono jego sekwencji, a jego obecność wykazano na podstawie pomiaru wielkości produktu amplifikacji (średnio 93,7 zasady). Przewidywana wielkość wzorca allelicznego D19S433*7 w zestawie Identifiler powinna wynosić 98 nukleotydów, co przy offsecie -2 nukleotydy odpowiada stwierdzonej wielkości 96,3 nukleotydów. Przewidywana wielkość wzorca allelicznego D19S433*7 w zestawie PowerPlex ESI powinna wynosić 164 nukleotydy, co przy offsecie $+2,9$ nukleotydów odpowiada stwierdzonej wielkości 166,8 nukleotyda.

Występowanie rzadkich wariantów genetycznych, odbiegających wielkością od definiowanego obszaru genotypowania, dowodzi konieczności dokładnego identyfikowania każdego z obserwowanych sygnałów fluorescencji podczas rozdzielania elektroforetycznych. W tym zakresie, nowo wprowadzane zestawy odczynnikowe charakteryzują się rozszerzoną liczbą wariantów obecnych we wzorcu allelicznym. Dostępny od kilku miesięcy na rynku polskim zestaw PowerPlex ESI 17 umożliwił ostateczne zweryfikowanie genotypów locus D19S433 u badanego mężczyzny i jego syna oraz potwierdzenie obecności rzadkiego wariantu D19S433*7. Analiza piśmiennictwa, w którym

publikowano częstości wariantów allelicznych locus D19S433 [11, 12] sugeruje, że nie był on znaleziony wśród zbadanych łącznie 667 mieszkańców Polski.

PIŚMIENNICTWO

1. Butler J. M.: Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J Forensic Sci.* 2006, 51, 253-265.

2. Butler J. M., Decker A. E., Vallone P. M., Kline M. C.: Allele frequencies for 27 Y-STR loci with U.S. Caucasian, African American, and Hispanic samples. *Forensic Sci Int.* 2006, 156, 250-260.

3. Wenk R. E.: Testing for parentage and kinship. *Curr Opin Hematol.* 2004, 11, 357-361.

4. Szibor R., Krawczak M., Hering S., Edelmann J., Kuhlisch E., Krause D.: Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int J Legal Med.* 2003, 117, 67-74.

5. Fung W. K., Wong D. M., Hu Y. Q.: Full siblings impersonating parent/child prove most difficult to discredit with DNA profiling alone. *Transfusion* 2004, 44, 1513-1515.

6. Berent J.: Biostatistical interpretation of DNA paternity testing in cases of closely related alleged and biological fathers. *Arch Med Sadowej Kryminol.* 2004, 54, 259-263.

7. Butler J. M., Shen Y., McCord B. R.: The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci.* 2003, 48, 1054-1064.

8. Coble M., Butler J.: Characterization of New MiniSTR Loci to Aid Analysis of Degraded DNA. *J. Forensic Sci.* 2005, 50, 43-53.

9. Sprecher C. J., McLaren R. S., Rabbach D., Krenke B., Ensenberger M. G., Fulmer P. M., Downey L., McCombs E., Storts D. R.: PowerPlex17 ESX and ESI Systems: A suite of new STR systems designed to meet the changing needs of the DNA-typing community. *Forensic Sci Int Genet. Supplement Series 2*, 2009, 2-4.

10. Brinkmann B., Klintschar M., Neuhuber F., Hühne J., Rolf B.: Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet.* 1998, 62, 1408-1415.

11. Czarny J., Grzybowski T., Derenko M. V., Malyarchuk B. A., Śliwka D. M.: Genetic variation of 15 STR loci (D3S1358, vWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, and D19S433) in populations of north and central Poland. *Forensic Sci Int.* 2005, 147, 97-100.

12. Wysocka J., Kapińska E., Rębała K., Szczerkowska Z., Cybulska L.: Genetyka populacyjna locus D19S433 w regionie Polski północnej. *Ann Acad Med Gedan.* 2005, 35, 181-185.

Adres do korespondencji:

Pracownia Hemogenetyki

Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej UJ CM

ul. Grzegorzeczka 16

31-531 Kraków

hemogenetyka@cm-uj.krakow.pl