

J.M. Butler, Amy E. Decker, Margaret C. Kline, Peter M. Vallone

Duplikacje chromosomowe na chromosomie Y i ich potencjalny wpływ na interpretację Y-STR

Journal of Forensic Sciences, 2005, vol. 50, nr 4

Chromosom Y jest specyficzny dla osobników męskich, co decyduje o możliwości jego wykorzystania w badaniach dotyczących napaści na tle seksualnym, kiedy istnieje potrzeba identyfikacji DNA sprawcy przy przeważającej ilości żeńskiego DNA ofiary (ryc. 3). Na chromosomie Y zidentyfikowano szereg markerów krótkich powtórzeń tandemowych (STR), na podstawie których stworzono multipleksowe sondy reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), umożliwiające rozróżnianie niespokrewnionych mężczyzn.

Jedno z potencjalnych zastosowań badania Y-STR to ustalanie liczby osób, których materiał biologiczny znalazł się w materiale dowodowym w przypadkach zgwałceń zbiorowych. W takich sytuacjach mamy często do czynienia z mieszanym profilem, który jest interpretowany drogą badania liczby oraz względnych wysokości pików występujących w danym locus. Większość powszechnie stosowanych markerów Y-STR to pojedyncze kopie, z wyjątkiem locus polimorficznego DYS385. Ponieważ więc chromosom Y nie ma chromosomu w pełni homologicznego, obserwujemy tylko jeden produkt PCR w wyniku amplifikacji markera Y-STR za pomocą jednej pary primerów PCR. Jednak ostatnio, w czasie przeprowadzania studium populacyjnego, stwierdzono, że w ponad 1% badanych próbek wystąpiło wiele alleli z loci, które wcześniej uważano za markery pojedynczych kopii. Poza

tym zaobserwowaliśmy jednoczesną duplikację nawet w czterech różnych loci Y-STR i „jednej kopii”, pochodzących od jednej osoby. W tym krótkim opracowaniu zostanie omówiony wpływ duplikowanych (a nawet tripletowanych) regionów chromosomu Y na ocenę tego, czy w materiale dowodowym występuje mieszanina DNA pochodząca od wielu dawców.

Materiały i metody

Próbki DNA

Anonimowe próbki krwi płynnej o znanej przynależności etnicznej zakupiono w Międzystanowym Banku Krwi (Interstate Blood Bank) w Memphis w stanie Tennessee i firmie Milenium Biotech, Inc. (Ft. Lauderdale w stanie Floryda) zgodnie z przepisami NIST (National Institute of Standards and Technology). Z próbek tych uprzednio izolowano DNA i typowano za pomocą 15 autosomalnych STR, z zastosowaniem kitu AmpFISTR® Identifier™ (Applied Biosystems z Foster City w Kalifornii). Miało to na celu wykazanie, że próbki się nie powtarzają i nie są mieszaninami.

Odczynniki Y-STR

Przy użyciu kitu PowerPlex® z Promega Corporation (z Madison w stanie Wisconsin) amplifikowano loci Y-STR: DYS19, DYS385a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS-392, DYS393, DYS437, DYS438

i DYS439. Amplifikację PCR przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta w 30 cyklach i na 1–2 ng matrycy DNA. Wykonano też badania za pomocą NIST 20plex i 11plex.

Wykrywanie i analiza produktów PCR

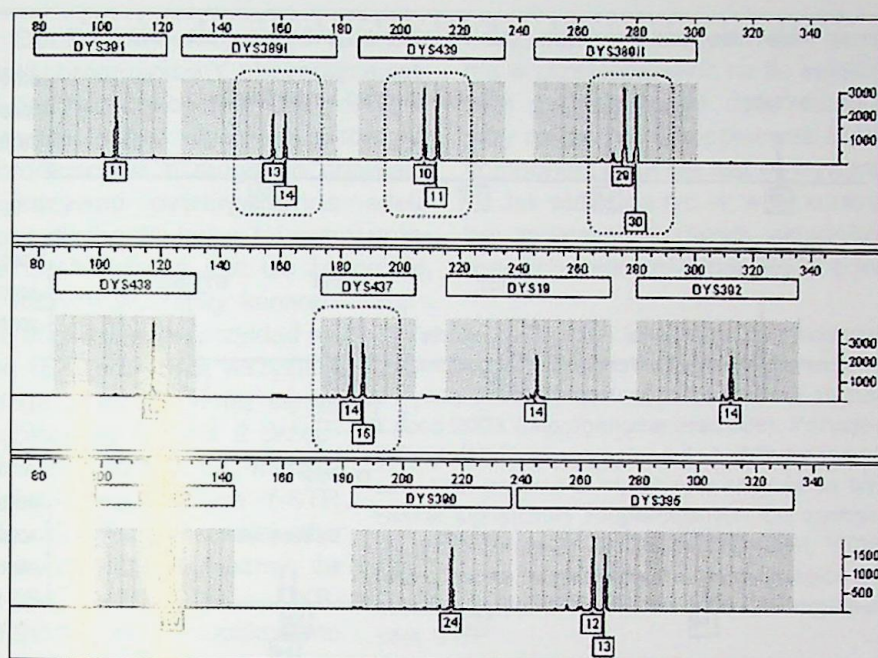
Rozdział i wykrywanie produktów PCR przeprowadzono na sekwenatorze ABI Prism® 310 albo ABI PRISM® 3100 (system 16-kapilary) (Applied Biosystems) zgodnie z protokołami producenta. Po zebraniu danych przeanalizowano próbki za pomocą Genescan® 3.7 (Applied Biosystems) i oznaczono allele za pomocą Genotypera 3.7 (Applied Biosystems).

Wyniki i omówienie

Duplikacje w wielu loci w obrębie jednej próbki

Przeprowadzając przegląd około 650 prób populacyjnych w USA, autorzy zaobserwowali w pewnej liczbie próbek duplikacje w kilku loci Y-STR. Niektóre z tych próbek zbadano ponownie przy użyciu kitu PowerPlex Y, aby zweryfikować fakt występowania wielu alleli w różnych loci Y-STR. Ryc. 1 przedstawia wyniki z Genotypera dla jednej z tych próbek, w których zaobserwowano wiele alleli Y-STR w więcej niż jednym locus. Należy zauważyć, że w locus DYS385 często obserwuje się dwa allele, ponieważ na chromosomie Y często

PRZEKŁADY



Ryc. 1. Elektroferogram PowerPlex Y dla próbki zawierającej materiał od jednego mężczyzny z wieloma allelami w loci „pojedynczej kopii” DYS389I, DYS389II, DYS439 i DYS437 (zaznaczone). Jednorodność próbki potwierdzono poprzez badanie 15 STR autosomalnymi za pomocą zestawu Identifiler. Warunki zgodne z opisem w części „Materiały i Metody” dla 1 ng DNA i wykrywaniem na ABI 3100.

występują dwie kopie. Ponieważ sygnały alleli DYS389I, DYS439, DYS389II i DYS437 są praktycznie równe w obrębie każdego locus, na pierwszy rzut oka to spostrzeżenie może sugerować obecność dwóch męskich komponentów w podobnych ilościach. Jednak w tej konkretnej próbce, która była też badana za pomocą 15 loci autosomalnych STR, stwierdzono proporcjonalne heterozygotyczne allele w 13 loci, a homozygoty tylko w TPOX i D5S818. Ponieważ po zbadaniu tak wielu polimorficznych STR w żadnym locus autosomalnym STR nie stwierdzono występowania więcej niż dwóch alleli, jest mało prawdopodobne, że w tej konkretnej próbce występuje dobrze zrównoważona mieszanina materiału od dwóch różnych mężczyzn.

Ze względu na fakt, że loci DYS389I, DYS439, DYS389II i DYS437 są zwykle uznawane za markery po-

jedynczych kopii i dlatego przy amplifikacji powinny dawać tylko jeden pik, jeżeli materiał pochodzi tylko od jednego mężczyzny – autorzy postanowili zbadać zjawisko duplikacji markera Y-STR trochę dokładniej i rozważyć jego potencjalny wpływ na wykrywanie mieszanin męczyzna-męczyzna za pomocą badania Y-STR.

Triplikacje

Próbkę, w której stwierdzono trzy allele w DYS19 z powodu triplikacji locus DYS19, amplifikowano przy użyciu kitu PowerPlex Y. Należy zauważyć, że wszystkie trzy allele dla DYS19 są zbliżone do siebie pod względem wysokości pików i że

Tabela 1

Zestawienie duplikacji albo triplikacji dla częstych loci Y-STR. Informacje pochodzą z Y-STR Haplotype Reference Database (<http://www.yhrd.org>), wydania 13. z 1 lipca 2004, składającego się z 25 066 minimalnych haplotypów. Wartości wytłuszczone obejmują allele rozdzielone jedną jednostką powtórzeń. AMG oznacza informacje otrzymane od Ann Marie Gross z Laboratorium Kryminalistycznego Biura Kryminalnego w Minnesocie. *Nomenklatura DYS448 za Redd i wsp.

Locus	Alleles Observed	Reference
DYS19	13,14	http://www.yhrd.org (2 times); Kayser and Sajantila 2001 (11)
DYS19	13,15	http://www.yhrd.org (1 time)
DYS19	14,15	http://www.yhrd.org (1 time)
DYS19	15,16	Henke et al. 2001 (24); http://www.yhrd.org (11 times)
DYS19	15,17	http://www.yhrd.org (1 time)
DYS19	16,17	http://www.yhrd.org (3 times)
DYS19	14,15,17	Schoske et al. 2004 (6); Santos et al. 1996 (10)
DYS389I	12,13	http://www.yhrd.org (1 time)
DYS389I	13,14	This study (1 time); http://www.yhrd.org (2 times); AMG (1 time)
DYS389II	28,29	http://www.yhrd.org (1 time)
DYS389II	29,30	This study (2 times); http://www.yhrd.org (2 times)
DYS389II	29,31	AMG (1 time)
DYS389II	30,31	This study (1 time); http://www.yhrd.org (1 time)
DYS389II	30,32	http://www.yhrd.org (1 time)
DYS390	23,24	AMG (1 time)
DYS391	9,10	http://www.yhrd.org (1 time); Fernandes et al. 2001 (25)
DYS391	10,11	http://www.yhrd.org (1 time)
DYS393	12,13	http://www.yhrd.org (1 time)
DYS393	13,14	http://www.yhrd.org (1 time)
DYS393	13,15	http://www.yhrd.org (1 time)
DYS435	11,12	Johnson et al. 2003 (26) (1 time)
DYS437	14,15	This study (1 time)
DYS437	15,16	AMG (1 time)
DYS438	9,10	Pepinski et al. 2004 (27) (1 time)
DYS439	10,11	This study (1 time); AMG (1 time)
DYS439	11,12	This study (1 time)
DYS448*	19,20	Schoske et al. 2004 (6) (3 times)
DYS448*	18,20	Schoske et al. 2004 (6) (1 time)
DYS448*	20,21	Schoske et al. 2004 (6) (1 time)
DYS385a/b	9,13,14	Sahoo et al. 2003 (28) (1 time)
DYS385a/b	11,12,13	Kurihara et al. 2004 (13) (1 time)
DYS385a/b	11,12,14	http://www.yhrd.org (1 time)
DYS385a/b	11,14,15	http://www.yhrd.org (2 times)
DYS385a/b	12,13,18,19	http://www.yhrd.org (1 time)
DYS385a/b	12,13,19,20	http://www.yhrd.org (1 time)
DYS385a/b	12,16,17	Kayser and Sajantila 2001 (11) (1 time)
DYS385a/b	13,14,15	http://www.yhrd.org (3 times); AMG (1 time)
DYS385a/b	13,14,18	AMG (1 time)
DYS385a/b	13,18,19	http://www.yhrd.org (1 time)
DYS385a/b	13,19,20	http://www.yhrd.org (1 time)
DYS385a/b	14,16,17	http://www.yhrd.org (1 time)
DYS385a/b	15,16,17	Butler et al. 2002 (12) (1 time)

PRZEKŁADY

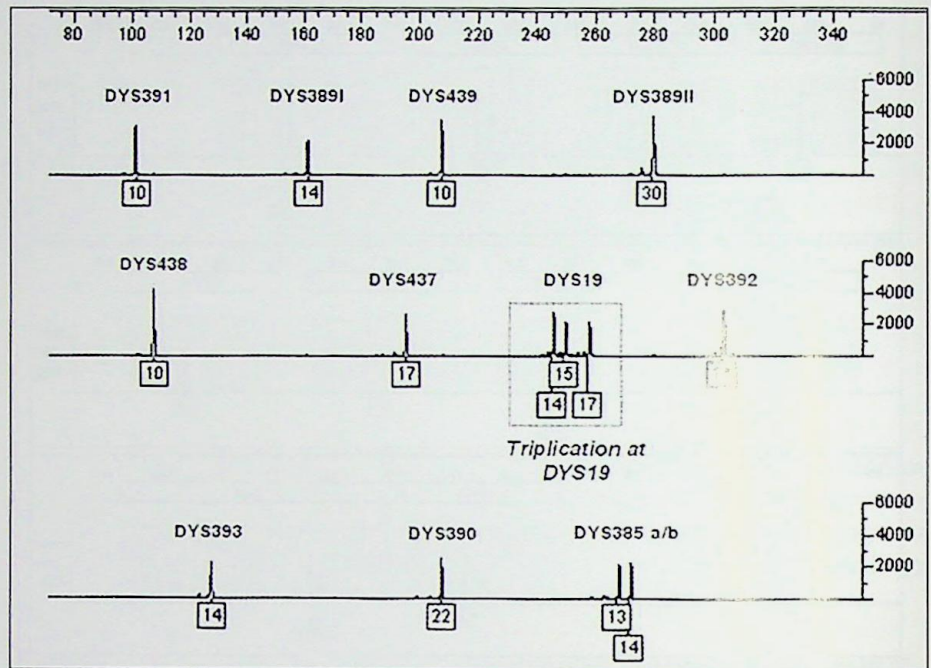
wszystkie wysokości pików alleli z innych loci są zbliżone, co sugeruje, że każdy zaobserwowany allel występuje na chromosomie Y tylko raz.

Chociaż triplikacje są rzadsze, źródła donoszą o ich występowaniu w DYS19 i DYS385. Triplikacje w DYS385 mogą powstawać w wyniku duplikacji jednego z już zduplikowanych alleli DYS385 albo duplikacji całego regionu chromosomu Y, zawierającego allel „a” i „b”. Często suma tych dwóch alleli jest równa innemu allelowi z duplikacjami DYS385.

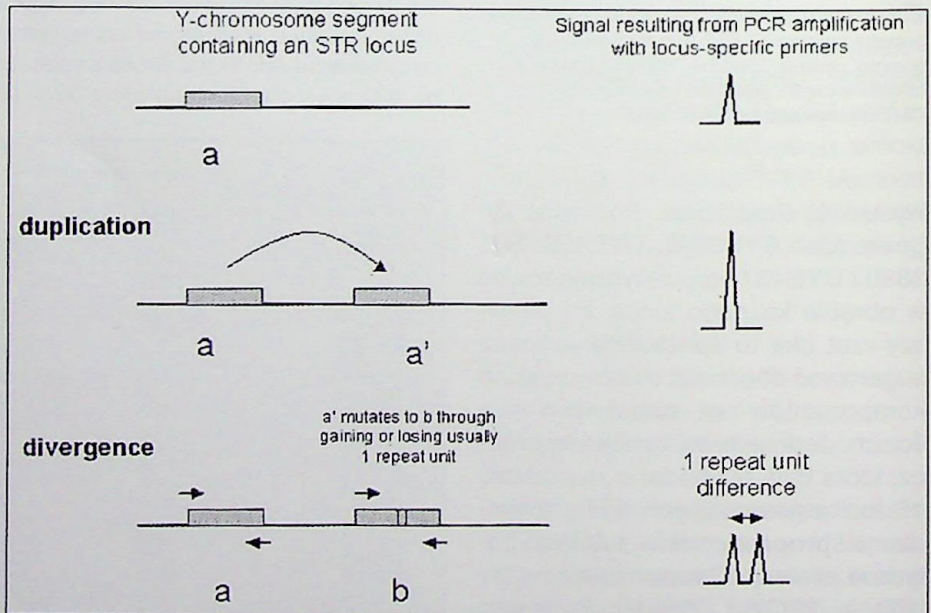
Model duplikacji locus Y-STR i dywergencji

Analiza skończonej sekwencji regionu eurochromatycznego chromosomu Y pozwala zauważyć, że duża część sekwencji chromosomu Y pojawia się więcej niż jeden raz, często we wzorze palindromicznym. Ponieważ na chromosomie Y zdaje się występować niewiele genów, istnieją mniejsze ograniczenia co do utrzymania konkretnego kontekstu sekwencji i dlatego możliwe są polimorfizmy insercji dużych regionów chromosomu Y. Przy braku rekombinacji z innymi chromosomami istnieje duże prawdopodobieństwo akumulacji zdarzeń insercji na chromosomie Y, co prowadzi do powstania licznych kopii, czyli obszarów przyłączenia alleli dla loci, które początkowo były markerami jednej kopii. Niedawno doniesiono o tym zjawisku dla obszarów flankowania DYS19. Po amplifikacji PCR zamiast jednej kopii locus amplifikowano dwie, jeżeli na chromosomie Y istniały dwa obszary przyłączenia. Duplikacje mogą też skomplikować interpretację polimorfizmu pojedynczego nukleotydu chromosomu Y (Y-SNP) z loci takimi jak P25 i 92R7, utrudniając też ewentualną interpretację mieszaniny z tymi loci, które występują wiele razy na chromosomie Y.

Ryc. 3 pokazuje, jak wystąpienie duplikacji Y-STR może powodować



Ryc. 2. Elektroferogram PowerPlex Y próbki zawierającej materiał od jednego mężczyzny, w którym stwierdzono trzy allele w DYS19. Warunki zgodne z opisem w części „Materiały i Metody” dla 1 ng DNA i wykrywaniem na ABI 3100.



Ryc. 3. Schemat procesu duplikacji i dywergencji, który może doprowadzić do powstania mnogich alleli na chromosomie Y, kiedy wykorzystuje się specyficzne dla locus primery Y-STR. Najpierw dochodzi do duplikacji odcinka (a) i powstaje odcinek (a'), który następnie może z czasem podlegać mutacji w odnośnym locus Y-STR poprzez nabycie albo utratę jednostki powtórzenia, aby stworzyć allel oznaczony (b). Zauważmy, że najlepiej zauważalne allele powinny znajdować się w odległości jednej jednostki powtórzenia, ponieważ mutacje jednostopniowe są najpowszechniejsze dla markerów STR.

pojawienie się najpierw zduplikowanego regionu (a') w innym miejscu na chromosomie Y. Region ten może następnie niezależnie mutować z upływem czasu z prędkością około 10^{-3}

na generację, jednostopniowo, prowadząc do powstania allela „b”, który najprawdopodobniej będzie się różnił od oryginału o jedną jednostkę powtórzenia.

PRZEKŁADY

Duplikowane mogą być całe odcińki chromosomu Y, obejmujące setki par zasad (kb). Markery Y-STR fizycznie leżące niedaleko siebie na chromosomie Y mogą po duplikacji wykazywać dywergencyjne allele specyficzne dla loci w tej samej próbie DNA. Istotne jest to, że próbki, w których wystąpiły konkretne duplikacje, na przykład alleli 15 i 16 DYS19, wszystkie mogą należeć do tej samej haplogrupy. Tabela 2 przedstawia zestawienie wszystkich pozycji markerów Y-STR dla obecnie najczęściej używanych loci. Zauważmy, że DYS437, DYS439 i DYS389I/II, które są duplikowane w próbce przedstawionej na ryc. 1, występują w odległości nie większej niż 150 kb od siebie i dlatego jest bardziej prawdopodobne, że były duplikowane razem. Ten region AZFa chromosomu Y został także odnotowany przez Boscha i Joblinga jako duplikowany u niektórych jednostek.

Przykład mieszaniny mężczyzna-mężczyzna

Aby sprawdzić, czy zaobserwowaną duplikację locus Y-STR można odróżnić od prawdziwej mieszaniny mężczyzna-mężczyzna, zbadano próbkę zawierającą materiał od dwóch różnych mężczyzn za pomocą zestawu PowerPlex Y. Tę konkretną mieszaninę dokładnie zanalizowano wcześniej jako „próbkę X” w studium NIST Mixed Stain Study #3, ponieważ zawiera przeważającą ilość DNA żeńskiego i dwa komponenty męskie. Poszczególne składniki z oznaczeniami autosomalnego allele STR mogą być trudne do rozszyfrowania, kiedy w próbce występuje DNA od więcej niż jednego dawcy. Jak zauważył

Prinz, ustalenie liczby dawców nasienia w przestępstwach na tle seksualnym jest normalnie dużo prostsze przy użyciu Y-STR, ponieważ żeński komponent DNA nie jest wykrywany.

Jak widać na ryc. 4, w tej konkretnej mieszaninie dwóch składników męskich większość loci Y-STR o jed-

kość pozostałych pików Y-STR w tym samym kolorze, co sugeruje, że występują dwie kopie allele 11 – po jednej od każdego dawcy płci męskiej. Zauważmy także, że w tej konkretnej mieszaninie locus DYS439 ma allele 10 i 13, które różnią się trzema jednostkami powtórzeń. Podobnie DYS-437 zawiera allele 14 i 16, które są w odległości dwóch jednostek powtórzeń.

W tym przykładzie, w którym wyraźny stosunek wysokości/pól pików od poszczególnych dawców jest bliski 1:1, nie jest możliwe przypisanie z pewnością alleli „większościowemu” czy „mniejszościowemu” dawcy (ważne, by odnotować, że większość mieszanin spotykanych w śladach prawdopodobnie nie będzie pozostawała w stosunku 1:1). Zamiast przypisywania alleli konkretnym dawcom w celu stworzenia haplotypów Y-STR, które można by porównać z bazą danych, jest bardziej prawdopodobne, że dojdzie do wykluczenia albo potwierdzenia zgodności podejrzanego z profilem materiału dowodowego. Przypisanie alleli konkretnemu dawcy w celu stworzenia złożonego haplotypu Y-STR najprawdopodobniej byłoby łatwiejsze przy mieszaninie o nierównych proporcjach (np. 3:1 zamiast 1:1).

Rozróżnianie mieszaniny od duplikacji locus

Aby ułatwić rozróżnianie ewentualnej duplikacji locus od potencjalnej mieszaniny materiału od dwóch mężczyzn przy wykonywaniu badania Y-STR, przedstawiamy tu kilka zasad opracowanych ad hoc. Po pierwsze, należy odnotować liczbę loci, w których wystąpiło więcej al-

Tabela 2. Fizyczna lokalizacja 50 markerów Y-STR na chromosomie Y na podstawie przeszukania sekwencyjnego z wykorzystaniem zestawienia sekwencji Human Genome, z lipca 2003 (<http://genome.ucsc.edu>). Pozycje w megasadach (Mb) są zaokrąglone do najbliższego tysiąca par zasad. Loci badane w niniejszym artykule są wytłuszczone. Bliskie sąsiedztwo zduplikowanych loci zaobserwowanych na ryc. 1 (DYS437, DYS439, DYS389I, YS389II) zaznaczono ramką, sugerującą, że ten cały region został zduplikowany, a potem, z upływem czasu, nastąpiła dywergencja alleli STR.

p-arm		q-arm	
Y STR Marker	Position (Mb)	Y STR Marker	Position (Mb)
DYS453	2.730	DYS391	13.413
DYS393	3.039	DYS635 (C4)	13.690
DYS446	3.039	DYS434	13.777
DXYS156Y	3.060	DYS437	13.778
DYS456	4.236	DYS435	13.807
DYS455	6.877	DYS439	13.826
DYS463	7.609	DYS389 I/II	13.923
DYS458	7.833	DYS388	14.057
DYS450	8.092	DYS442	14.071
DYS449	8.183	DYS438	14.248
DYS454	8.190	DYS441	14.292
DYS19	9.437	DYS436	14.514
Centromere		DYS447	14.589
		YCAIII a	15.409
		YCAIII b	15.477
		DYS390	16.521
		Y-GATA-A10	17.965
		Y-GATA-H4	17.990
		DYS426	18.381
		YCAII a	18.869
		YCAII b	19.754
		DYS385 a	19.998
		DYS385 b	20.039
		DYS461 (A7.2)	20.247
		DYS460 (A7.1)	20.247
		DYS462	20.514
		DYS452	20.817
		DYS392	21.780
		DYS448	23.511
		DYS464 a	24.388
		DYS464 b	24.619
		DYS459 a	25.225
		DYS425 a	25.326
		DYS464 c	26.021
		DYS464 d	26.245
		DYS425 b	26.940
		DYS459 b	27.041

nej kopii ma więcej niż jeden pik i wysocze polimorficzne locus DYS385 zawiera cztery piki zamiast typowych dwóch. Dodatkowo wysokość/pole pików dla DYS392 wynosi mniej więcej dwa razy tyle co analogiczna wiel-

leli. Im większa liczba loci z więcej niż jednym allelem, z wyjątkiem układu DYS385a/b, tym większe prawdopodobieństwo, że w próbce występuje mieszanina materiału od kilku mężczyzn.

Po drugie, jeżeli więcej alleli występuje w więcej niż jednym locus, należy ustalić, czy te loci są zlokalizowane blisko siebie na chromosomie Y, posługując się informacjami na temat względnej pozycji Y-STR, np. zawartych w tabeli 2. Jeżeli domniemane zduplikowane loci są blisko siebie (np. <1 Mb), wówczas cały odcinek chromosomu Y mógł zostać zduplikowany kiedyś w przeszłości i obecnie ma rozbieżne allele. Im

wanych za pomocą primerów specyficznych dla locus, aby sprawdzić, czy któreś loci posiadają allele różniące się o więcej niż jedną jednostkę powtórzeń. Duplikacje zazwyczaj są w odległości większej niż jedno powtórzenie, ilość produktu PCR dla alleli jest podobna (np. DYS537 allele 14 i 15), podczas gdy mieszaniny najprawdopodobniej będą miały jedno albo więcej loci o rozstrzeleniu większym niż jedna jednostka powtórzenia (np. DYS437 allele 14 i 16). Jeżeli przyjrzymy się odległościom alleli dla duplikowanych loci w tabeli 1, dojdziemy do wniosku, że większość alleli dzieli jedna jednostka powtórzeń. Wreszcie należy zbadać

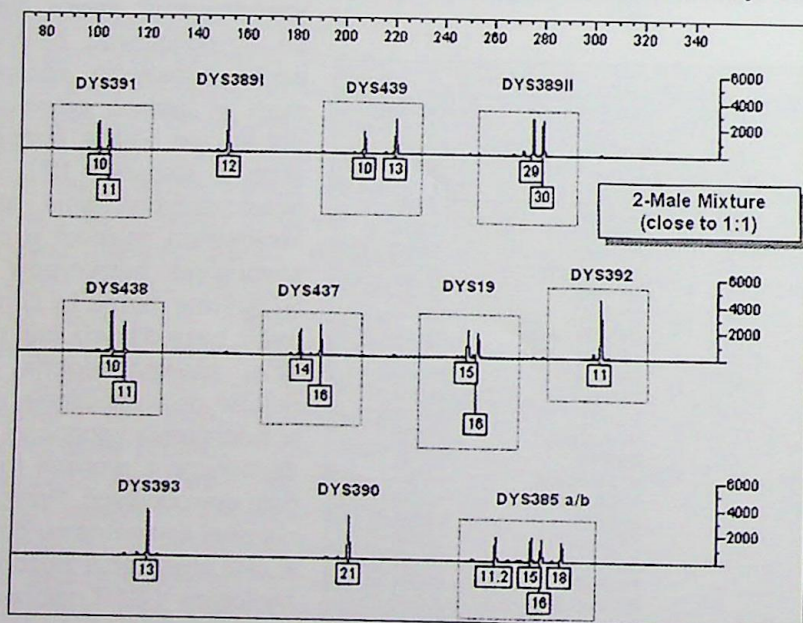
duplikacja musi wystąpić u prawdziwego sprawcy. Dlatego przypadki duplikacji takie jak opisane w tym opracowaniu nie powinny wywoływać niepokoju w kontekście badań kryminalistycznych wykonywanych przy użyciu markerów Y-STR. Celem autorów jest zademonstrowanie, że w próbce zawierającej materiał od jednej osoby mogą wystąpić wielokrotne duplikacje i dlatego nie należy formułować pochopnych wniosków o do liczby dawców, kiedy w locus o pojedynczej kopii zaobserwuje się więcej niż jeden allel o równej intensywności.

Duplikacja locus na chromosomie Y jest pod wieloma względami analogiczna do heteroplazmii w DNA mitochondrialnym, co w zależności od okoliczności może przyczynić się do zwiększenia „siły” zgodności między dwiema próbkami. Opisane zjawisko duplikacji loci nie powinno uniemożliwiać wiarygodnej interpretacji, chociaż może utrudnić wyjaśnianie wyników w sądzie. Specyficzny dla osobników męskich chromosom Y jest użytecznym narzędziem wspomagającym identyfikację, choć może się ona okazać bardziej złożona, niż początkowo sądzono.

Przegląd literatury zawierającej doniesienia na temat duplikacji Y-STR

Autorzy dokonali przeglądu ok. 200 publikacji, zawierających informacje na temat populacji haplotypowej Y-STR. Opracowania pochodzą ze zbioru literatury na temat STR znajdującego się pod adresem http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_ref.htm. Część wyników studiów populacyjnych można znaleźć w Y-STR Haplotype Reference Database (YHRD; <http://yhrd.org>, wcześniej www.ystr.org).

oprac. Ewa Nogacka



Ryc. 4. Elektroferogram PowerPlex Y dla mieszaniny materiału od 2 mężczyzn. W zaznaczonych loci jest widocznych wiele alleli, które są oddzielone więcej niż jedną jednostką powtórzenia. Oprócz tego wysoko polimorficzny locus DYS385 ma cztery allele zamiast normalnych dwóch. Warunki zgodne z opisem w części „Materiały i Metody” dla 1 ng DNA i wykrywaniem na ABI 3100.

bardziej domniemane zduplikowane loci są oddalone od siebie na chromosomie Y (np. DYS19 i DYS438, które znajdują się na różnych ramionach chromosomu Y), tym bardziej prawdopodobne jest to, że próbka zawierająca wiele alleli w wielu loci jest mieszaniną.

Po trzecie, należy zbadać odległość wielokrotnych alleli amplifiko-

DYS385 i sprawdzić, czy to wysoko polimorficzny locus posiada więcej niż dwa allele. Jeżeli tak, i spełnione są inne kryteria dla mieszaniny, istnieje wówczas większe prawdopodobieństwo, że mamy do czynienia z mieszaniną niż duplikacją locusu.

Oczywiście jeżeli ślad dowodowy zawiera materiał z jednego źródła, w którym wykryto duplikację, ta sama