



APPLICATION OF X-STR LOCI IN FORENSIC GENETICS

Maciej JEŃDRZEJCZYK¹, Renata JACEWICZ², Andrzej KOZDRAJ³, Stefan SZRAM¹, Jarosław BERENT²

¹ *Department of Medico-Legal and Insurance Certification, Medical University, Łódź, Poland*

² *Department of Legal Medicine, Medical University, Łódź, Poland*

³ *Department of Medical Law, Medical University, Łódź, Poland*

Abstract

The most popular markers applied in forensic genetics have been STR loci, both autosomal and Y-chromosomal. In more complex kinship analyses involving relatives, particularly in the maternal line, mitochondrial DNA analysis may also be helpful. But X-chromosome STR markers can be applied in such cases in forensic genetics too. The availability of Mentype Argus X-8 Kit for simultaneous analysis of eight X-STR loci is causing increasing interest among forensic scientists. Statistical parameters obtained in different studies on X-STR indicate their usefulness to forensic genetics investigations. This paper is focused on the genetic characteristics and unique inheritance mode of the X-chromosome, illustrated with a few examples of casework analyses, where X-STR markers may be applied, often successfully complementing other routinely used microsatellite loci.

Key words

X-STR markers; Argus X-8; Paternity investigation; Forensic genetics.

Received 1 October 2009; accepted 9 December 2009

1. Description of the X chromosome

Morphologically differentiated mammalian sex chromosomes – X and Y – evolved approx. 310–170 millions years ago [5, 20] from a pair of homomorphic autosomes. This hypothesis can be supported by the existing homology between X and Y chromosomes, which can be seen for example in two PAR regions located at the ends of the short and long arms of sex chromosomes, labeled PAR1 and PAR2, respectively (pseudoautosomal region 1 and 2) [12, 20] and also the presence of some common genes for both sex chromosomes [30]. Homology in the PAR1 region [33], containing 24 genes existing between chromosomes X and Y, is a result of obligatory recombination between them during meiosis only in male cells. Two copies of genes exist in the PAR1 region on both the chromosomes and are not silenced during the process of inactivation of chromosome X [20]. It is assumed that

a first step in evolution of sex chromosomes was differentiation of the SRY gene on protochromosome Y and reduction of recombination in this region with its homologue present on protochromosome X [30]. Contrary to chromosome X, chromosome Y lost almost all of the features of its autosomal ancestor in the course of evolution, including most genes formerly common to both chromosomes. The presence of only a single copy of chromosome X in male cells means that in female cells in which two copies of chromosome X are present, a mechanism of equaling of level of gene expression must have arisen [5]. In female mammalian cells, loss of genes common to chromosome X and Y resulted in development of a process of chromosome X inactivation. According to Lyon's hypothesis, this process leads to equalization of the expression level of genes linked to chromosome X between sexes [16]. The human X chromosome is 155 million base pairs long [30], and exons of 1098 genes constitute merely

1.7% of the total chromosome X sequence. Therefore, based on the length of gene loci present on chromosome X, it has been estimated that in total only 33% of the sequence undergoes transcription [20]. There are a lot of diseases which are closely linked to the specificity of chromosome X inheritance. At this point, it is worth mentioning recessive disorders inextricably linked to sex, such as hemophilia or daltonism [24], which are expressed mainly in males. This is due to the fact that a single X chromosome with an altered (damaged) allele for a particular trait inherited from the mother cannot be compensated by a “healthy” allele, as such a counterpart is not present on chromosome Y, which is inherited from the father. Women have two X chromosomes in their cells, one inherited from the mother and one from the father. Men have only one X chromosome inherited from the mother, because the father passes on chromosome Y. Since women have two X chromosomes, recombination between them is possible and thus 2/3 of X chromosomes have an opportunity for recombination in each generation [21]. Chromosome X has features that should be possessed by a molecular marker utilized in population genetics and phylogenetics studies [21]. These features include: simple direct determination of haplotype in men (single copy), lower recombination and mutation coefficients and faster genetic drift caused by lower effective population size [13].

2. Microsatellite sequences in forensic genetics

Examination of polymorphic microsatellite loci, mainly those with a tetranucleotide repetitive unit, is now considered a basic research tool applied in forensic genetics [6]. Variation in short tandem repeat (STR) loci located both on autosomal chromosomes and X and Y human sex chromosomes is therefore a subject of studies that are carried out mainly using multiplex PCR analysis and ready to use commercial kits [11]. A set of well characterised autosomal STR loci which have been described in detail in a number of research articles, including from the point of view of their practical use [9, 23] – typically ranging from 10 (SGM+™) to 15 (Identifiler™, PowerPlex16®) genetic markers – now constitute the most frequently used loci for expert work in forensic laboratories. In more complex cases, a basic panel of STR loci may be insufficient and microsatellite markers located on X and Y chromosomes may be applied. Whereas Y-STR loci (e.g. Yfiler™) are already among routinely utilized markers in particular types of medico-legal analyses (identification of a perpetrator in a rape case, analysis of relationship (kin-

ship) in the male lineage), in which their usefulness has been confirmed, application of X-STR markers is only now beginning to be considered as a new method that can be useful in solving some particular cases.

3. Linkage groups of X-STR markers

26 trinucleotide and 90 tetranucleotide polymorphic repetitive units have been described [25] on chromosome X, of which only approx. 39 are currently used in research carried out in medico-legal genetics [14]. Because of the different number of X chromosomes in male and female cells, it is assumed that the general mutation rate characteristic for repetitive sequences in chromosome X is slightly lower than for autosomal markers [21, 24], and this is reflected in the lower genetic diversity of chromosome X [21]. Studies on variation in chromosome X STR loci have undoubtedly been simplified by the development by Biotype AG of the commercially available Mentype Argus X-8 kit. This kit enables simultaneous analysis of eight X-STR markers, including four constituting “core loci” and also the amelogenin locus (HUMAMEL) [15]. Eight X-STR markers included in the Argus X-8 kit have been classified into four linkage groups according to their position on chromosome X: 1. DXS10135-DXS8378, 2. DXS7132-DXS10074, 3. HPRTB-DXS10101, and 4. DXS10134-DXS7423 [25]. Because chromosome X markers are located on a single chromosome, X-STR loci are affected by linkage disequilibrium (*LD*). This term describes a relation that can exist between loci located in relative proximity on the same chromosome. Because of this phenomenon, alleles of two different loci which are located in proximity can be transmitted together. Linkage disequilibrium between X-STR loci requires that, as in the case of Y chromosome markers, observed haplotype frequencies rather than allele frequencies are calculated based on appropriate population data [7]. It is interesting to note that observed haplotypes forming particular linkage groups usually stay unchanged through many generations and thus can be treated as significant evidence of relationship between subjects [26]. Standard equations for calculation of selected statistical parameters for autosomal markers are not applicable to X-STR markers, mainly because males have only one copy of the X chromosome [25]. Some attempts have already been made to simplify interpretation of results and evaluation of evidential value in studies of STR loci located on chromosome X by application of equations that take into account their individual features [1, 19, 24]. Statistical calculations should be carried out based on a large and

representative database of allele or haplotype frequencies characteristic for the studied population. The growing interest in chromosome X STR markers has manifested itself, for example, in the development of databases of allele or haplotype frequencies characteristic for particular loci and populations [3, 4, 10, 18, 19, 29, 31] and attempts to apply them in laboratory practice, particularly in cases in which a standard set of STR markers does not yield an unambiguous conclusion. Cases that are difficult in terms of genetic analysis, like those lacking genetic material from one of the involved parties or involving heavily degraded genetic material or very low amounts of template DNA (LCN) [11, 17] are often encountered in laboratory practice. It is often a challenge to gain a positive and unambiguous result in such cases. Genetic identification requires both improvement of present genetic systems used in analysis of DNA polymorphism and application of new STR markers, which now have an important place among methods utilized in world laboratories [6].

4. Examples of application of X chromosome markers

Chromosome X STR markers may be useful in a variety of cases and thus have high potential for application in genetic analyses in the area of DNA polymorphism [25]. They can be applied in various disputed paternity cases and examinations of more distant kinships [22, 26, 28]. It is worth drawing attention to cases involving incompleteness of reference material, where one of the parties, e.g. the father can not be included in the study, and his biological parents or brother are subjected to analysis as a substitute, or cases carried out without reference material from the mother of the child. In some such cases, a significant advantage of X chromosome markers over autosomal markers is noticeable. Since the daughter inherits the complete X chromosome haplotype from her father, cases concerning examinations of relationships: putative father – daughter constitute a good example of the usefulness of application of chromosome X markers in forensic genetic analysis [26]. This is a result of a special way of inheritance of sex chromosomes. Table I shows results obtained in the Laboratory of Forensic Genetics of the Department of Legal Medicine in Łódź in two paternity cases. In the first case, confirmation was reported (A) and in the second case (B) exclusion was reported based on examination of a “standard trio”, i.e. putative father, child and mother. Detailed analysis of cases reporting paternity exclusion revealed that such a conclusion was based on a minimum number of four

discordant markers (on average five) between defendant father and putative daughter, most frequently in more polymorphic loci (DXS10134, DXS10074, DXS10101, DXS10135) characterized by higher *MEC* (mean exclusion chance) values than “core loci” [10], and thus more useful. Moreover, based on examination of chromosome X markers, it was possible to directly establish a biological relationship between two sisters, since they had a single chromosome X haplotype inherited from their common biological father. The above examples indicate that application of additional chromosome X markers can be useful in cases concerning analysis of putative paternity of a man relative to a daughter. They can be particularly useful as a set of additional markers to routinely analyzed autosomal loci in cases with incomplete reference material, lacking a sample from the biological mother. Interpretation of the presented case based exclusively on examination of several autosomal STR loci could cause difficulties in terms of low evidential value (e.g. too low value of paternity index *PI* to meet guidelines of the Commission of Forensic Genetics of the Polish Society of Legal Medicine and Criminology, PTMSiK). However, additional confirmation of paternity based on X-STR loci analysis may improve the evidential value of a report from genetic examinations.

New X-STR markers may also be useful in cases concerning identification of human bodies. Identification of an individual may be achieved, for example, by studying the biological relationship between the deceased person and a putative child (e.g. daughter). Table II shows results of a case where a match between X chromosome haplotypes of a man of unknown identity and those of his putative daughter was ascertained. Additional analysis of autosomal markers and subsequent statistical analysis confirmed that result. Therefore, the evidential value of a scientific report based on additional analysis of X-STR loci will be significantly increased compared to evidential value obtained only from examination of routinely analyzed autosomal polymorphic loci. Moreover, X-STR markers can also be successfully used in cases concerning determination of maternity of a given woman in relation to a putative son, as he inherits a complete chromosome X from his mother.

In some cases examination of putative paternity is carried out without direct analysis of genetic material collected from a putative father (who, for example, fails to provide a reference sample or is dead). In such cases, analysis of STR systems can include the closest relatives of the defendant [9], most frequently the parents. Based on an X-STR profile from the mother of the putative father, it is possible to confirm or exclude

TABLE I. EXAMPLES OF PATERNITY INVESTIGATION CASES USING THE ARGUS X-8 KIT

Non-exclusion case									
	Amel	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135
Alleged father	X, Y	10	11	14	14	36	15	29.2	22.1
Child	X, X	10	11, 13	14, 16	14, 16	35, 36	15, 16	29.2, 30	19, 22.1
Mother	X, X	10	12, 13	16	13, 16	35	8, 16	28.2, 30	19, 20
Exclusion case									
	Amel	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135
Alleged father	X, Y	10	12	14	13	35	17	29.2	20.1
Child	X, X	10	13	14, 16	13	37, 38	7, 17	31.2, 32	22, 23
Mother	X, X	10, 13	13	14, 15	13, 16	34, 37	16, 17	29, 32	19, 23

paternity of a child provided that the child in question is a female, because the father inherits a single X chromosome from his mother, which will be further passed on to all his daughters. Such analysis can be valuable especially when examination of autosomal markers does not yield an unambiguous conclusion [2]. Analysis of X-STR markers also allows determination of a common ancestor of subjects, even a few generations back. Thus, it is possible, for example, to partially reconstruct the X chromosome genotype of the grandmother of a child based on the X haplotype of the father and the X chromosome profile of his daughter. In cases where the studied males are related to the defendant (putative father), autosomal markers have a too low *MEC* value, and in such cases application of chromosome X markers may constitute a valuable addition to autosomal markers. In situations where a father and son are involved in a paternity case, they do not have any common allele on chromosome X which would be identical by descent. This means that chromosome X markers will be more useful in such a case than autosomal STR loci [24]. In disputed paternity cases, sometimes a discordance in single loci between putative father and a child is observed and analysis of several dozen autosomal STR markers which are routinely examined in such cases is inconclusive. According to recommendations of the Commission of Foren-

sic Genetics of the PTMSiK, a minimum number of four loci is conclusive for paternity exclusion. A problem arises when, for example, only two discordant systems out of 15 analyzed loci are detected in a case. In such a situation, it is difficult to decide if the determined discordances are a result of the occurrence of several paternal mutations in genetic material of the child or if it is a case of exclusion of paternity and the true father is an untested close relative of the putative father, e.g. his brother [22]. In such cases, it is recommended to extend the range of analyzed autosomal markers in order to gain an unambiguous result or apply chromosome Y markers, studying inheritance in the male lineage. However, when the studied child is a female, Y-STR markers are not applicable. Then X-STR markers may be considered as an effective research tool [10, 25, 26], and application of an additional autosomal multiplex STR kit will not be necessary. This can be illustrated by the example presented in Table III concerning a disputed paternity case investigated at the Laboratory of Forensic Genetics of the Department of Legal Medicine in Łódź. In this case, closely related individuals – father and son – were considered as putative fathers of the child. The performed examinations excluded the son as the father of the child in question.

TABLE II. EXAMPLE OF CORPSE IDENTIFICATION INVESTIGATION WITH KINSHIP ANALYSIS (ARGUS X-8)

	Amel	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135
Alleged father	X, Y	11	21	14	28.2	13	15	15	38
Child	X, X	10, 11	21, 24	14	28.2, 33.2	13	8, 15	15	36, 38

TABLE III. EXAMPLE OF PATERNITY INVESTIGATION WITH TWO ALLEGED FATHERS (AF) AND A FEMALE CHILD

	Amel	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135
AF I (son)	X, Y	10	13	14	15	37.2	17	28.2	24
AF II (father)	X, Y	10	12	15	14	36	15	30.2	20
Child	X, X	10, 12	12, 13	14, 15	14, 15	35, 36	15, 19	30.2, 31.2	20, 24
Mother	X, X	11, 12	13, 14	13, 14	14, 15	35, 38	17, 19	31.2, 32	20, 24

5. Summary

Polymorphic STR markers located on the human X chromosome are relatively recent subjects of more thorough studies on their practical application in forensic genetics examinations. The available literature on this subject [8, 14] indicates that X-STR polymorphic loci may be a valuable addition to routinely used autosomal markers or Y-STR loci, particularly in cases with incomplete reference material or in difficult cases [16, 19], including ones in which genetic material is limited in amount or problematic as in the case of DNA extracted from historical material which is classified as LCN [4]. Examples presented in the present paper represent justification of implementation of chromosome X STR markers into laboratory practice, since on many occasions they can be valuable for the analyzed case. It is necessary to continue the launched study on polymorphism of loci located on chromosome X. The performed evaluations of the usefulness of the human X-STR markers [4, 10, 19] by analysis of biostatistical parameters (power of discrimination – *PD*, mean exclusion chance – *MEC*, polymorphism information content – *PIC*) have confirmed their significant informativeness and thus their value in forensic genetics studies. The obtained results confirm the significant opportunities for application of chromosome X markers together with other STR loci in many areas in forensic genetics by making interpretation of ambiguous (doubtful) results easier and enabling their more accurate analysis.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Medical University in Łódź no. 502-17-693.

References

1. Ayres K. L., Powley W. M., Calculating the exclusion probability and paternity index for X-chromosomal loci in the presence of substructure, *Forensic Science International* 2005, 149, 201–203.
2. Barbaro A., Cormaci P., X-STR typing for identification casework, *International Congress Series* 2006, 1288, 513–515.
3. Becker D., Rodig H., Augustin C. [et al.], Population genetic evaluation of eight X-chromosomal Short Tandem Repeat loci using Mentype Argus X-8 PCR amplification kit, *Forensic Science International: Genetics* 2008, 2, 69–74.
4. Branicki W., Wolańska-Nowak P., Parys-Proszek A., Application of the Mentype X-8 Kit to forensic casework, *Problems of Forensic Sciences* 2008, 73, 53–64.
5. Brown C. J., Greally J. M., A stain upon the silence: genes escaping X inactivation, *Trends in Genetics* 2003, 19, 432–438.
6. Butler J. M., *Forensic DNA typing: Biology, technology and genetics of STR markers*, NY Elsevier Press, New York 2005.
7. Edelmann J., Hering S., Szibor R. [et al.], Characterisation of the STR markers DXS10146, DXS10134 and DXS10147 located within a 79.1 kb region Xq28, *Forensic Science International: Genetics* 2008, 2, 41–46.
8. Edelmann J., Lessig R., Klintschar M. [et al.], Advantages of X-chromosomal microsatellites in deficiency paternity testing: presentation of cases, *International Congress Series* 2004, 1264, 257–259.
9. Jacewicz R., Jędrzejczyk M., Berent J. [et al.], Population database on 15 autosomal STR loci in 1000 unrelated individuals from the Lodz region of Poland, *Forensic Science International: Genetics* 2008, 2, e1–e3.
10. Jędrzejczyk M., Jacewicz R., Berent J., Distribution of chromosome X STR markers DXS10135, DXS10074, DXS10101 and DXS10134 and their usefulness in forensic genetics, *Problems of Forensic Sciences* 2009, 77, 89–97.
11. Jobling M., Gill P., Encoded evidence: DNA in forensic analysis, *Nature Reviews Genetics* 2004, 5, 739–751.

12. Kohn M., Kehrer-Sawatzki H., Vogel W. [et al.], Wide genome comparisons reveal the origins of the human X chromosome, *Trends in Genetics* 2004, 20, 598–603.
13. Laan M., Wiebe V., Khusnutdinova E. [et al.], X chromosome as a marker for population history: linkage disequilibrium and haplotype study in Eurasian populations, *European Journal of Human Genetics* 2005, 13, 452–462.
14. Machado F., Medina-Acosta E., Genetic map of human X-linked microsatellites used in forensic practice, Letter to the Editor, *Forensic Science International: Genetics* 2009, 3, 202–204.
15. Mentype® Argus X-8 PCR Amplification Kit Manual, Biotype AG, Germany 2007.
16. Migeon B. R., Why females are mosaics, X-chromosome inactivation, and sex differences in disease, *Gender Medicine* 2007, 4, 97–105.
17. Morling N., Forensic genetics, *The Lancet* 2004, 364, 10–11.
18. Oguzturun C., Thacker C. R., Syndercombe C. D., Population study of four X-chromosomal STR loci in the UK and Irish population, *International Congress Series* 2006, 1288, 283–285.
19. Pepiński W., Skawrońska M., Niemcunowicz-Janica A. [et al.], Polymorphism of four X-chromosomal STRs in a Polish population sample, *Forensic Science International* 2005, 151, 93–95.
20. Ross M. T., Grafham D. V., Coffey A. J., The DNA sequence of the human X chromosome, *Nature* 2005, 434, 325–337.
21. Schaffner S., The X chromosome in population genetics, *Nature* 2004, reviews 5, 43–51.
22. Silveira D., Silva F. F., Jesus P. R. [et al.], Use of X-linked short tandem repeat loci in routine parentage casework, *Transfusion* 2007, 47, 1050–1053.
23. Szczerkowska Z., Kapińska E., Wysocka J. [et al.], Northern Polish population data and forensic usefulness of 15 autosomal STR loci, *Forensic Science International* 2004, 144, 69–71.
24. Szibor R., X-chromosomal markers: Past, present and future, *Forensic Science International: Genetics* 2007, 1, 93–99.
25. Szibor R., Krawczak M., Hering S. [et al.], Use of X-linked markers for forensic purposes, *International Journal of Legal Medicine* 2003 117:67-74.15
26. Szibor R., Plate I., Edelmann J. [et al.], Chromosome X haplotyping in deficiency paternity testing principles and case report, *International Congress Series* 2003, 1239, 815–820.
27. Tillmar A. O., Mostad P., Montelius K. [et al.], Analysis of linkage and linkage disequilibrium for eight X-STR markers, *Forensic Science International: Genetics* 2008, 3, 37–41.
28. Toni C., Presciuttini S., Spinetti I. [et al.], Usefulness of X-chromosome markers in resolving relationships: Report of a Court case involving presumed half sisters, *International Congress Series* 2006, 1288, 301–303.
29. Verzeletti A., Cerri N., Gasparini F. [et al.], X-chromosome polymorphism on DXS8378, DXS7132, HPRTB and DXS7423 loci in 130 individuals from Brescia (northern Italy), *Legal Medicine* 2007, 9, 158–160.
30. Waters P. D., Shetty S., Mammalian sex – Origin and evolution of the Y chromosome and SRY, *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2007, 18, 389–400.
31. Zalán A., Volgyi A., Brabetz, W. [et al.], Hungarian population data of eight X-linked markers in four linkage groups, *Forensic Science International* 2008, 175, 73–78.

Corresponding author

Dr n. med. Maciej Jędrzejczyk
Zakład Orzecznictwa Sądowo-Lekarskiego
i Ubezpieczeniowego
Katedra Medycyny Sądowej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Sędziowska 18 a
91-304 Łódź
e-mail: maciej.jedrzejczyk@umed.lodz.pl

ZASTOSOWANIE *LOCI* X-STR W GENETYCE SĄDOWEJ

1. Charakterystyka chromosomu X

Morfologicznie zróżnicowane chromosomy płci ssaków – X i Y – wyewoluowały ok. 310–170 milionów lat temu [5, 20] z pary homomorficznych autosomów. Tezę tę może potwierdzać istniejąca homologia pomiędzy X a Y m.in. w dwóch regionach PAR leżących na końcach krótkich i długich ramion chromosomów płci, odpowiednio oznaczonych jako PAR1 oraz PAR2 (pseudoautosomalny region 1 i 2) [12, 20] oraz obecność niektórych wspólnych dla chromosomów płci genów [30]. Homologia w regionie PAR1 [33] zawierającym 24 geny, a występująca pomiędzy chromosomami X i Y, jest związana z obowiązkową rekombinacją pomiędzy nimi zachodzącą podczas mejozy wyłącznie w komórkach męskich. Geny w regionie PAR1 występują w dwóch kopiach na obu chromosomach i nie są wyciszane w procesie inaktywacji chromosomu X [20]. Przyjmuje się, że pierwszym krokiem w ewolucji chromosomów płci było zróżnicowanie się na protochromosomie Y genu SRY i ograniczenie rekombinacji w tym regionie z jego odpowiednikiem obecnym na protochromosomie X [30]. W odróżnieniu od chromosomu X, chromosom Y utracił w toku ewolucji prawie wszystkie cechy autosomalnego przodka, włączając w to większość genów kiedyś wspólnych dla obu chromosomów.

Obecność tylko jednej kopii chromosomu X w męskich komórkach wykształciła potrzebę powstania mechanizmów wyrównujących poziom ekspresji chromosomu X występującego w żeńskich komórkach aż w dwóch kopiach [5]. W żeńskich komórkach ssaków główną konsekwencją utraty genów wspólnych dla chromosomów X i Y było wykształcenie się procesu inaktywacji chromosomu X, co według hipotezy zaproponowanej przez Lyon, ma prowadzić do wyrównania poziomu ekspresji genów sprzężonych z chromosomem X pomiędzy płciami [16]. Ludzki chromosom X ma długość ok. 155 milionów par zasad [30], a eksony 1098 genów stanowią zaledwie 1,7% całej sekwencji chromosomu X. W związku z tym na podstawie długości *loci* genowych chromosomu X oszacowano, że w sumie tylko 33% sekwencji ulega transkrypcji [20].

Znanych jest wiele chorób, które są ściśle związane ze sposobem dziedziczenia chromosomu X. Należy w tym miejscu wspomnieć o recesywnych zaburzeniach nierozdzielnie związanych z płcią, jak np. hemofilia czy daltonizm [24] ujawniających się głównie u mężczyzn, gdyż dziedzicząc po matce chromosom X ze zmienionym (wadliwym) allelem odpowiadającym za daną cechę, nie mają możliwości uniknięcia wystąpienia tej cechy z powodu braku „zdrowego” odpowiednika na chromoso-

mie Y odziedziczonym po ojcu. Kobieta dziedziczy chromosom X od matki i od ojca, czego efektem jest występowanie dwóch chromosomów X w komórkach u kobiet. Mężczyzna posiada tylko jeden chromosom X – pochodzący od matki, natomiast po ojcu dziedziczy chromosom Y. Ponieważ kobiety posiadają dwa chromosomy X, możliwa jest rekombinacja pomiędzy nimi, a tylko 2/3 chromosomów X ma możliwość rekombinacji w każdym pokoleniu [21].

Chromosom X posiada cechy, jakie powinien mieć marker, który mógłby być stosowany w badaniach z zakresu genetyki populacyjnej czy filogenetycznych [21]. Do cech tych należy zaliczyć m.in. łatwość bezpośredniego określenia haplotypu u mężczyzn (jedna kopia), posiadanie niższych wartości współczynników rekombinacji oraz mutacji, a także szybszy dryf genetyczny ze względu na mniejszą efektywną wielkość populacji [13].

2. Sekwencje mikrosatelitarne w genetyce sądowej

Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnych *loci* głównie o czteronukleotydomowej strukturze powtórzeń stanowi obecnie podstawowe narzędzie badawcze stosowane w genetyce sądowej [6]. *Loci* zawierające krótkie powtórzenia tandemowe (STR) występujące zarówno w obrębie chromosomów autosomalnych, jak i chromosomów płci człowieka – X i Y. Stanowią one tym samym przedmiot badań nad ich zmiennością przy wykorzystaniu przede wszystkim analizy typu multiplex-PCR prowadzonej za pomocą gotowych zestawów dostępnych w handlu [11]. Zestaw autosomalnych *loci* STR, dobrze poznanych i szczegółowo opisanych m.in. pod kątem ich zastosowania w praktyce badawczej w licznych publikacjach [9, 23], w typowym zakresie od 10 (SGM+™) do 15 (Identifiler™, PowerPlex16®), stanowi dziś podstawę wykonywanych ekspertyz w laboratoriach sądowych. W bardziej skomplikowanych sprawach, do rozstrzygnięcia których podstawowy panel *loci* STR nie wystarcza, można wykorzystać markery mikrosatelitarne zlokalizowane na chromosomach X oraz Y. O ile *loci* typu Y-STR [11] (m.in. Yfiler™) znajdują się już w kanonie rutynowo stosowanych markerów w kilku analizach sądowo-lekarskich (identyfikacja sprawcy gwałtu, ustalenie pokrewieństwa w linii męskiej), w których została potwierdzona ich przydatność, to zastosowanie markerów X-STR dopiero zaczyna być postrzegane jako nowy sposób na rozstrzygnięcie niektórych typów spraw.

3. Grupy sprzężeń markerów X-STR

W obrębie chromosomu X wyodrębniono 26 trójnukleotydowych oraz 90 czteronukleotydowych sekwencji powtórzonych wykazujących polimorfizm [25], z czego tylko ok. 39 jest obecnie używanych w badaniach z zakresu genetyki sądowo-lekarskiej [14]. Ze względu na różną liczbę chromosomów X w komórkach męskich i żeńskich przyjmuje się, że ogólne tempo występowania mutacji w obrębie sekwencji powtórzonych chromosomu X jest nieco niższe niż dla markerów autosomalnych [21, 24], co z kolei wpływa na mniejszą różnorodność genetyczną chromosomu X [21].

Badania nad zmiennością *loci* STR chromosomu X z pewnością ułatwiło opracowanie przez firmę Biotype AG komercyjnego zestawu Mentype Argus X-8 zapewniającego jednoczesną analizę ośmiu markerów X-STR, w tym czterech „*loci* rdzenia” oraz *locus* amelogeniny (HUMAMEL) [15]. W zestawie Argus X-8 osiem markerów typu X-STR zostało zakwalifikowanych do wyróżnionych ze względu na swoją pozycję na chromosomie X czterech grup sprzężeń (ang. linkage group): 1. DXS10135-DXS8378, 2. DXS7132-DXS10074, 3. HPRTB-DXS10101, 4. DXS10134-DXS7423 [25].

W związku z lokalizacją markerów chromosomu X na tym samym chromosomie, *loci* X-STR narażone są na występowania pomiędzy nimi tzw. nierównowagi sprzężeń (*LD*, ang. linkage disequilibrium). Termin ten odnosi się do zależności, jaka może występować pomiędzy *loci* położonymi dość blisko siebie w obrębie tego samego chromosomu. W ten sposób allele należące do dwóch różnych, lecz położonych w swoim niedalekim sąsiedztwie *loci*, mogą być przekazywane razem. Istnienie możliwej nierównowagi sprzężeń pomiędzy *loci* X-STR będzie wymuszać sposób obliczania częstości obserwowanych haplotypów na podstawie odpowiednich danych populacyjnych, jak to ma miejsce np. w przypadku markerów chromosomu Y, a nie na podstawie częstości poszczególnych alleli [7]. Co ciekawe, obserwowane haplotypy z poszczególnych grup sprzężeń zazwyczaj pozostają niezienne przez wiele pokoleń, a więc mogą stanowić znaczący dowód świadczący o wzajemnym pokrewieństwie badanych osób [26]. Dla markerów X-STR nie mają zastosowania standardowe wzory do obliczeń wybranych parametrów statystycznych wyprowadzone dla markerów autosomalnych, co jest związane m.in. z posiadaniem przez mężczyzn tylko jednej kopii chromosomu X [25]. Podjęte już jednak zostały próby ułatwienia interpretacji uzyskiwanych wyników i oceny wartości dowodowej badań *loci* STR chromosomu X poprzez zastosowanie wzorów uwzględniających ich specyfikę [1, 19, 24]. Obliczenia statystyczne należy przeprowadzać tylko w oparciu o dużą, reprezentatywną bazę danych częstości alleli lub haplotypów występujących w badanej populacji.

Zainteresowanie markerami genetycznymi STR chromosomu X przejawia się m.in. tworzeniem baz danych częstości występowania alleli należących do poszczególnych *loci* lub haplotypów dla danych populacji [3, 4, 10, 18, 19, 29, 31], ale i próbą wdrażania ich w praktykę laboratoryjną, szczególnie w sprawach, w których stosowany rutynowo zakres markerów STR nie daje jednoznacznego rozstrzygnięcia.

Trudne pod względem analizy genetycznej sprawy, takie jak te, w których nie ma materiału genetycznego pochodzącego od jednej ze stron lub obserwowana jest degradacja DNA albo też ilość matrycy jest bardzo mała (LCN) [11, 17], są niejednokrotnie spotykane w praktyce laboratoryjnej. Stanowią one wyzwanie do uzyskania pozytywnego i jednoznacznego wyniku analizy. Analiza genetyczna wymaga więc zarówno udoskonalania obecnie używanych systemów analizy polimorfizmu DNA, jak i wdrażania nowych markerów typu STR, które zajmują jak dotąd czołowe miejsce wśród stosowanych metod w laboratoriach na świecie [6].

4. Przykłady zastosowania markerów chromosomu X

Markery STR chromosomu X posiadają szerokie zastosowanie ze względu na swój duży potencjał pomocny w wykonywanych badaniach genetycznych z zakresu analizy polimorfizmu DNA [25]. Mogą być one wykorzystywane do ustalania spornego ojcostwa czy badania dalszego pokrewieństwa [22, 26, 28]. Warto tu zwrócić uwagę na sprawy „niepełne”, a więc takie, w których jedna ze stron, np. ojciec, nie może być poddana badaniu, a w zastępstwie badani są jego biologiczni rodzice lub brat, bądź też badania odbywające się bez udziału matki dziecka.

W badaniach niektórych spraw „niepełnych” zauważalna jest znacząca przewaga markerów X nad autosomalnymi. Sprawy z udziałem pary domniemany ojciec-córka stanowią dobry przykład zastosowania markerów chromosomu X w analizie genetycznej, gdyż córka dziedziczy cały haplotyp X ojca [26]. Jest to skutek szczególnego sposobu dziedziczenia chromosomów płci. W tabeli I przedstawiono wyniki otrzymane w Pracowni Genetyki Sądowej ZMS w Łodzi w dwóch sprawach o ustalenie ojcostwa – potwierdzeniowej (A) oraz wykluczeniowej (B) z udziałem „standardowej trójki” badanych (domniemany ojciec, dziecko i matka dziecka). W przeanalizowanych sprawach wykluczających ojcostwo zawsze obserwowano minimum cztery niezgodności (średnio pięć) pomiędzy pozwanym mężczyzną a domniemaną córką, szczególnie w obrębie bardziej polimorficznych *loci* (DXS10134, DXS10074, DXS10101, DXS10135) charakteryzujących się wyższymi wartościami *MEC* (średnia szansa wykluczenia) niż „*loci* rdze-

nia” [10], a przez to bardziej przydatnymi. Ponadto, w oparciu o badanie markerów chromosomu X, u dwóch siostr można było bezpośrednio ustalić istniejące pokrewieństwo pomiędzy nimi, gdyż jeśli pochodzą one od wspólnego ojca, to posiadają taki sam haplotyp X odziedziczony właśnie po nim. Zatem przydatne dla sprawy ustalenia spornego ojcostwa mężczyzny względem córki może okazać się wykorzystanie dodatkowych markerów chromosomu X obok rutynowo stosowanego zestawu *loci* autosomalnych, szczególnie gdy jest to sprawa „niepełna”, a biologiczna matka dziecka nie może być poddana badaniu. Analiza przytoczonego przykładu sprawy wykonanej wyłącznie w oparciu o zestaw kilkunastu autosomalnych *loci* STR może być trudna i skutkować niską wartością dowodową opinii (np. zbyt małą wartością szansy ojcostwa *PI*, odbiegającą od wytycznych Komisji Genetyki Sądowej Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii). Natomiast poprzez uzyskanie dodatkowego potwierdzenia ojcostwa w zakresie *loci* X-STR wartość dowodowa wydawanej opinii może wzrosnąć.

Nowe markery X-STR mogą także mieć zastosowanie w przypadkach spraw zleczanych przez organy ścigania, a dotyczących identyfikacji zwłok nieznanymi osobami lub szczątków ludzkich. Ustalenia tożsamości osoby o nieznanymi personaliach można dokonać np. poprzez badania pokrewieństwa pomiędzy denatem a domniemanym dzieckiem (np. córką). W tabeli II zaprezentowano wyniki konkretnej sprawy, w której wykazano została zgodność haplotypu X zmarłego nieznanego mężczyzny z profilem chromosomu X badanej kobiety (domniemanej córki). Dodatkowo przeprowadzona analiza markerów autosomalnych wraz z analizą statystyczną również potwierdziła ten wynik. W związku z tym wartość dowodowa opinii w kwestii spornego ojcostwa wykonana z wykorzystaniem dodatkowej analizy markerów X-STR obok rutynowo stosowanej analizy polimorfizmu autosomalnych *loci* będzie znacznie wyższa niż w przypadku analogicznej opinii opartej wyłącznie o autosomy. Ponadto markery X-STR mogą być także z powodzeniem wykorzystane w przypadku ustalania macierzyństwa danej kobiety względem jej domniemanego syna, gdyż odziedziczy on po matce kompletny chromosom X.

Zdarza się, że ustalenie spornego ojcostwa odbywa się bez bezpośredniego badania materiału genetycznego pobranego od domniemanego ojca (który np. uchyla się od stawiennictwa lub nie żyje). Wówczas analiza polimorfizmu STR będzie mogła zostać przeprowadzona w oparciu o materiał DNA pobrany od najbliższych krewnych pozwanego mężczyzny [9], najczęściej od rodziców. Na podstawie profilu X matki ze strony ojca można wykluczyć lub potwierdzić ojcostwo względem dziecka pod warunkiem, że jest nim dziewczynka, gdyż ojciec otrzyma od swojej matki jeden chromosom X, który z kolei zostanie odziedziczony przez wszystkie

jego córki. Wykonanie takiej analizy jest bardzo cenne dla sprawy zwłaszcza wtedy, gdy markery autosomalne nie dają jednoznacznego rozstrzygnięcia [2]. Analiza markerów X-STR pozwala także na ustalenie wspólnego przodka badanych osób nawet kilka pokoleń wstecz. Jest zatem możliwe np. częściowe odtworzenie genotypu chromosomu X babki dziecka w oparciu o haplotyp X ojca oraz o profil chromosomu X jego córki.

W sprawach, w których badani mężczyźni są spokrewnieni z pozwanym mężczyzną (domniemanym ojcem), markery autosomalne posiadają zbyt niską wartość *MEC* i w takich przypadkach zastosowanie markerów chromosomu X może stanowić cenne uzupełnienie dla autosomów. Gdy pozwani o ojcostwo mężczyźni to ojciec i syn, nie będą oni posiadać żadnego wspólnego allela z chromosomu X identycznego z pochodzenia (*ibd* – *ang.* identical by descent). Taka sytuacja wskazuje na to, że markery X będą bardziej przydatne dla sprawy niż autosomalne *loci* typu STR [26].

W przypadku ustalania spornego ojcostwa może zdarzyć się czasem występowanie pojedynczych niezgodności w *loci* pomiędzy między domniemanym ojcem i dzieckiem, a zestaw kilkunastu autosomalnych markerów STR stosowanych w rutynowej pracy laboratoryjnej nie da jednoznacznego rozstrzygnięcia co do wyniku badania. Według zaleceń Komisji Genetyki Sądowej PTMSiK wystąpienie minimum czterech niezgodności pomiędzy domniemanym ojcem a dzieckiem decyduje o wykluczeniu jego ojcostwa. Ale co zrobić, jeśli istnieją np. tylko dwie niezgodności na 15 analizowanych *loci*? Występuje wówczas trudność w stwierdzeniu, czy ujawnione niezgodności są wynikiem wystąpienia np. kilku mutacji odojcowskich w materiale genetycznym dziecka, czy też mamy do czynienia z wykluczeniem ojcostwa badanego w sprawie mężczyzny względem dziecka, a prawdziwym ojcem jest niebadany bliski krewny domniemanego ojca, np. brat [22]. W takich sytuacjach praktyka laboratoryjna każe rozszerzyć zakres badania o kolejne markery autosomalne, by uzyskać jednoznaczny wynik lub wykorzystać markery chromosomu Y, sprawdzając dziedziczenie w męskiej linii rodowej. Jednak w sytuacji, gdy poddawane badaniu dziecko to dziewczynka, markery Y-STR nie będą pomocne. W takiej sytuacji markery typu X-STR mogą okazać się dobrym narzędziem badawczym [10, 25, 26], a używanie kolejnego multipleksowego zestawu do amplifikacji autosomalnych *loci* STR nie będzie konieczne. Ilustracją tego przykładu są zaprezentowane w tabeli III dane otrzymane w jednej ze spraw o ustalenie ojcostwa wykonanej w Pracowni Genetyki Sądowej ZMS w Łodzi, w której brali udział blisko spokrewnieni ze sobą mężczyźni – ojciec i syn jako domniemani ojcowie badanego dziecka. Przeprowadzone badania wykluczyły syna jako ojca badanego dziecka.

5. Podsumowanie

Polimorficzne markery STR zlokalizowane w obrębie chromosomu X człowieka stosunkowo od niedawna są obiektem wzmożonych badań pod kątem ich praktycznego wykorzystania w szeroko pojętych analizach w genetyce sądowej. Dostępna literatura na ten temat [8, 14] świadczy o tym, że polimorficzne *loci* typu X-STR mogą stanowić cenne uzupełnienie dla rutynowo stosowanych markerów typu autosomalnego czy *loci* Y-STR, szczególnie w sprawach „niepełnych” bądź trudnych [16, 19], także wtedy, gdy materiał genetyczny jest ograniczony ilościowo lub jest trudny do analizy, jak to ma miejsce w przypadku DNA wyizolowanego z materiału historycznego czy o cechach LCN [4].

Przedstawione w niniejszej pracy przykłady spraw uzasadniają wdrażanie markerów STR chromosomu X do praktyki laboratoryjnej, co może okazać się niejednokrotnie cenne dla analizowanej sprawy. Konieczne jest kontynuowanie rozpoczętych badań nad polimorfizmem *loci* STR chromosomu X, a dokonana w różnych pracach [4, 10, 19] ocena przydatności markerów X-STR poprzez analizę obliczonych dla nich parametrów biostatystycznych (siła dyskryminacji – *PD*, średnia szansa wykluczenia – *MEC*, zawartość informacji o polimorfizmie – *PIC*) pozwala na stosowanie ich w badaniach z zakresu genetyki sądowej, potwierdzając tym samym znaczną informatywność polimorficznych *loci* typu STR chromosomu X człowieka.

Uzyskane wyniki wskazują na duże możliwości zastosowania markerów chromosomu X wspólnie z innymi *loci* STR na różnych płaszczyznach badań z zakresu genetyki sądowej, ułatwiając interpretację wątpliwych wyników oraz pozwalając na ich jeszcze dokładniejszą analizę.

Podziękowania

Temat opracowany został w ramach prac własnych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, nr 502-17-693.