



APPLICATION OF THE MENTYPE ARGUS X-8 KIT TO FORENSIC CASEWORK

Wojciech BRANICKI, Paulina WOLAŃSKA-NOWAK, Agnieszka PARYS-PROSZEK, Tomasz KUPIEC

Institute of Forensic Research, Krakow, Poland

Abstract

Chromosome X STR markers constitute a valuable addition to autosomal, ChrY and mtDNA markers, which are routinely used in forensic identification studies. Due to a specific inheritance mode of chromosome X, analysis of ChrX markers may be particularly useful in deficiency paternity and some kinship cases. This paper presents population data for STR systems included in the Mentype Argus X-8 kit obtained for a population sample from southern Poland. The calculated values of *PIC*, *MEC* and *PD* indicate that the analysed set of Chr-X STRs is suitable for forensic analyses in the studied population. Performed analyses confirmed that the sensitivity and efficiency of the Argus X-8 kit is sufficient to analyse typical forensic specimens. Based on the obtained results it can be concluded that Mentype Argus X-8 represents a set of additional markers which can be useful for forensic investigations in particular cases.

Key words

Chromosome X; ChrX-STR markers; Population data; Forensic identification; Human remains; Incest case.

Received 24 April 2008; accepted 30 April 2008

1. Introduction

Interpretation of forensic parentage examinations may sometimes be very problematic. Difficulties may arise, for example, in disputed paternity cases where discrimination between close relatives must be achieved (e.g. incest cases) and in identification of human remains where reference material is limited to a single relative (e.g. father or mother) or only DNA from distant relatives is available. In such cases routinely analysed autosomal markers often do not allow unambiguous interpretation. The obtained genetic results may support the hypothesis that there is a relationship between the examined individuals, but the low evidential value does not allow more certain conclusions to be drawn. In these cases, further analyses including an expanded panel of markers are recommended. Depending on the assumed relation between

reference and evidence material, STRs located on Y chromosome or variation in mtDNA may be helpful. Chromosome X STR markers may constitute a valuable addition to autosomal, ChrY and mtDNA markers. Due to a specific inheritance mode of chromosome X, analysis of ChrX markers may be useful in deficiency paternity and some kinship cases [6]. Undoubtedly, analysis can be particularly valuable in father-daughter or mother-son relationship testing. However, the relatively high recombination rate characteristic for the X chromosome may cause some interpretation difficulties in cases where mother to son chromosome X transmission is to be analysed [1]. The father transmits his complete X chromosome to all daughters as a haplotype but nevertheless the genotyping data for his daughters contain additional information from the mother-inherited X chromosome.

Additional genetic markers are very often required in cases concerning identification of human remains. Thus, a level of sensitivity that enables analysis of heavily degraded samples is very appreciated in forensic studies. Mentype Argus X-8 is a commercial kit, which enables simultaneous analysis of eight STR systems located on chromosome X and additionally also amelogenin as a sex marker. These STRs are clustered in four linkage groups: 1) DXS10135 and DXS8378, 2) DXS7132 and DXS10074, 3) HPRTB and DXS10101, 4) DXS10134 and DXS7423.

This paper presents population data for STR systems included in the Mentype Argus X-8 kit obtained for a population sample from southern Poland. We also show some examples of casework analyses including identification of human remains and incest cases and discuss benefits and drawbacks associated with Chr-X STRs as forensic identification markers.

2. Materials and methods

2.1. Study population

The studied population consisted of 204 unrelated males ($n = 103$) and females ($n = 101$) living in southern Poland. Buccal swabs or peripheral blood were used for DNA extraction. Casework samples from two incest cases were used for testing the value of ChrX-STRs in complex parentage examinations. Bone specimens previously examined as evidence material in forensic identification cases were used in validation studies. In one such case, ChrX-STRs were used as an additional marker.

2.2. Genotyping

DNA from population samples as well as casework specimens (except for bone material) was extracted using Biorobot M48 apparatus and the magnetic extraction method (Qiagen, Hilden, Germany). Following DNA extractions, DNA concentration was quantified using the fluorimetric method and Fluoroscan Ascent FL apparatus (Labsystems, Helsinki, Finland). Bone material was extracted using the phenol-chloroform procedure followed by Centricon 100 DNA concentration. DNA concentration was evaluated with the Quantifiler Human DNA Quantitation Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). PCR amplifications were done according to the protocol recommended for the Mentype Argus X-8 kit [3]. Whenever possible 1–2 ng of DNA template was used for amplification reactions. The total volume of PCR reactions was 15 μ l

in the case of population samples and 25 μ l in the case of bone specimens and other casework samples. A total of 30 PCR cycles was used in each case. Amplifications were conducted on a GenAmp 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, USA). The PCR products were separated on an ABI3100 Avant capillary platform according to the protocol recommended by the manufacturer.

2.3. Statistical analyses

Allele frequencies for males and females were calculated with SPSS software (www.spss.com). For female samples, expected and observed heterozygosity (HET_{exp} , HET_{obs}) were calculated with Arlequin 3.0 computer software [2]. Arlequin was also used for testing the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) as well as linkage disequilibrium (LD) between the analysed Argus-X8 loci. The values of polymorphism information content (PIC), power of discrimination (PD) and mean exclusion chance (MEC ; different formulas) were calculated with an online calculator [7]. Differences between allele frequencies for males and females were evaluated using G-statistic tests (i.e. likelihood-ratio tests) with software developed by G. Carmody according to [5].

3. Results

3.1. Population data

No significant differences between allele frequencies characteristic for male and female populations samples were revealed using the G-statistics test [5]. The cumulated allele frequencies obtained for the eight analysed Chr-X STR systems in the population sample of males and females from southern Poland are presented in Table I.

The calculated statistical parameters describing the usefulness of the markers in forensic genetic investigations are given in Table II. With one exception, the analysed loci were found to be in HW equilibrium. The locus DXS7132 demonstrated statistically significant HW disequilibrium, which was also present after Bonferroni correction for multiple testing ($p < 0.00625$). Linkage disequilibrium (LD) analysis revealed random association of alleles at different analysed loci. The initial LD revealed between loci HPRTB-DXS7132 and DXS7132-DXS10134 was found to be statistically insignificant after Bonferroni correction for multiple testing ($p > 0.00179$). For all examined

TABLE I. ALLELE FREQUENCIES FOR THE EIGHT X-STR MARKERS ANALYSED WITH THE ARGUS X-8 KIT IN A POPULATION SAMPLE FROM SOUTHERN POLAND

Allele	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135
4						0.0033		
7						0.0557		
8						0.1279		
9	0.0164	0.0328				0.0098		
10	0.3672	0.0033						
11	0.3246	0.0820		0.0197				
12	0.2656	0.3443		0.0754				
13	0.0262	0.3246	0.1180	0.3115		0.0197		
14		0.1508	0.2820	0.3607		0.0098		
15		0.0590	0.4295	0.2000		0.0557		
16		0.0033	0.1475	0.0230		0.2328		0.0098
17			0.0230	0.0098		0.2656		0.0262
18						0.1508		0.0230
19						0.0590		0.0557
19.1								0.0131
20						0.0066		0.0721
20.1								0.0033
21						0.0033		0.1016
21.1								0.0197
22								0.0590
22.1								0.0197
23								0.0656
23.1								0.0164
23.2								0.0033
24								0.0754
24.1								0.0033
25								0.0852
25.1								0.0066
26								0.0787
27							0.0328	0.0754
27.2							0.0721	
28							0.0197	0.0623
28.2							0.1311	
29							0.0295	0.0393
29.2							0.1475	
30							0.0557	0.0262
30.2							0.1377	

TABLE I. ALLELE FREQUENCIES FOR THE EIGHT X-STR MARKERS ANALYSED WITH THE ARGUS X-8 KIT IN A POPULATION SAMPLE FROM SOUTHERN POLAND (cont.)

Allele	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135
30.3							0.0131	
31					0.0033		0.0754	0.0033
31.2							0.1016	
32					0.0230		0.0721	0.0262
32.2							0.0492	
33					0.0492		0.0393	0.0098
33.2							0.0033	
34					0.1311		0.0197	0.0033
35					0.1639			0.0131
36					0.2262			0.0033
37					0.1934			
38					0.0656			
38.3					0.0098			
39					0.0131			
39.3					0.0459			
40					0.0033			
40.3					0.0361			
41.3					0.0164			
42.3					0.0066			
43.3					0.0098			
44.3					0.0033			

loci, the values of $MEC_{Koshida}$ (devised for ChrX markers for analysis of trios including a daughter) are larger compared to values of $MEC_{Krueger}$ (introduced for autosomal markers for analysis of trios involving mother, child and putative father). This may indicate that in trios involving a daughter, ChrX markers are more effective than autosomal ones (Table II).

3.2. Application of Argus X-8 kit to forensic casework

3.2.1. Identification of human remains

Ten heavily degraded bone specimens examined previously in identification cases were subjected to Argus X-8 analysis. In five cases, complete or partial Argus X-8 profiles were obtained. This pattern was completely concordant with the previous genotypings with the Identifiler kit (Table III). Hence, the experiments indicated that the kit has similar sensitivity and

can be successfully applied to examination of bone material.

The casework example involves application of Argus X-8 to identification of a seriously decomposed corpse found in a forest. According to the police hypothesis the body was that of a missing male individual. The only available reference material was collected from the male victim's daughter. Analysis of complete Identifiler loci was possible but the calculated probability of paternity was still insufficient to fulfil Polish norms regarding level of certainty. The calculated LR had a value of 43,000 in favour of the hypothesis about the father-daughter relationship. Thus, the calculated probability of paternity had a value of 0.99998. No other additional marker except for ChrX-STR was suitable in this case. Results obtained with Mentype Argus X-8 supported the father-daughter relationship between examined individuals since the complete male haplotype could be recognised in the reference DNA profile of his putative daughter (Table IV).

TABLE II. STATISTICAL PARAMETERS CALCULATED FOR THE ANALYSED X-STR MARKERS

Parameter/ locus	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135
$MEC_{Krueger}$	0.4137	0.5158	0.4542	0.4845	0.7089	0.6531	0.8038	0.8746
$MEC_{Kishida}$	0.6242	0.6989	0.6503	0.6768	0.8335	0.7969	0.8916	0.9336
$MEC_{Desmareis}$	0.6267	0.7024	0.6515	0.6804	0.8413	0.806	0.8991	0.9357
$MEC_{Desmareis Duo}$	0.4804	0.5648	0.507	0.5393	0.7395	0.6915	0.8237	0.8827
$PIC_{Botstein}$	0.6267	0.7024	0.6515	0.6804	0.8413	0.806	0.8991	0.9357
PD_{female}	0.8409	0.8934	0.8613	0.8788	0.964	0.9489	0.9839	0.9929
PD_{male}	0.6892	0.7429	0.7004	0.7271	0.8568	0.8272	0.9066	0.9391
HET_{obs}	0.68317	0.65347	0.68317	0.69307	0.79208	0.78218	0.88119	0.90099
HET_{exp}	0.67273	0.73523	0.71829	0.71588	0.85129	0.82321	0.90730	0.93867
SD	0.00043	0.00040	0.00049	0.00004	0.00043	0.00039	0.00031	0.00019
HWE	0.70784	0.28522	0.64314	0.00305	0.49532	0.72669	0.12013	0.18623

MEC – mean exclusion chance, PIC – polymorphism information content, PD_{female} – discrimination power in females, PD_{males} – discrimination power in males, H_{obs} – observed heterozygosity, HET_{exp} – expected heterozygosity, SD – standard deviation – HET_{obs} , HET_{exp} , HWE – p -values for the Hardy-Weinberg equilibrium.

TABLE III. COMPARATIVE ANALYSIS OF NUMBER OF STR LOCI POSITIVELY ANALYSED WITH THE IDENTIFILER KIT AND ARGUS X-8 KIT

Bone	Identifiler	Argus X-8
1	NA	NA
2	NA	NA
3	NA	NA
4	6/15 (40%)	2/8 (25%)
5	6/15 (40%)	7/8 (87.5%)
6	14/15 (93.3%)	7/8 (87.5%)
7	6/15 (40%)	5/8 (62.5%)
8	14/15 (93.3%)	8/8 (100%)
9	NA	NA
10	NA	NA

NA – no amplification.

3.2.2. Examples of attempted analysis of complex incest cases

The first example of a paternity investigation concerns a case where a child was born to a juvenile mother (K.). There was a suspicion that the biological father of the baby could be a close relative of the mother. Neither of her four brothers nor her father ad-

TABLE IV. RESULTS OF ARGUS X-8 GENOTYPING PERFORMED ON AN EVIDENTIAL BONE SPECIMEN AND REFERENCE DNA MATERIAL COLLECTED FROM THE VICTIM'S PUTATIVE DAUGHTER

STR	Bone sample	Putative daughter
DXS8378	11	11, 12
HPRTB	13	13, 14
DXS7423	13	13, 14
DXS7132	14	13, 14
DXS10134	36	32, 36
DXS10074	18	9, 18
DXS10101	30	30, 32.2
DXS10135	21	21, 23
Amelogenin	X, Y	X

mitted to paternity, hence the prosecutor ordered that reference material be collected from each of them.

Blood samples of the new-born child (Z.), the juvenile mother (K.), her (the juvenile mother's) father (J.) and her four brothers (S., A., Kz., Kr.) were investigated with Identifiler kit (data not present). According to the obtained results, one of the victim's brothers (S.) could not be excluded as the father of the new-born child. The remaining ones were excluded in at least two loci. The likelihood ratio for the hypothesis that S.

TABLE V. RESULTS OF TYPING J.'S FAMILY IN THE RANGE OF ARGUS X-8 LOCI

STR	J. (father of the family)	K. (J.'s daughter)	Z. (K.'s daughter)	S. (J.'s son and K.'s brother)	A. (J.'s son and K.'s brother)	Kz. (J.'s son and K.'s brother)	Kr. (J.'s son and K.'s brother)
DXS10135	22	20, 22	20, 22	22	20	20	22
DXS8378	10	10, 11	11, 11	11	11	11	11
DXS7132	15	15, 17	14, 15	14	14	14	17
DXS10074	18	17, 18	17, 18	17	17	17	17
HPRTB	12	12, 13	12, 13	12	13	12	12
DXS10101	28.2	28.2, 31	31, 31.2	31.2	31	31.2	31.2
DXS10134	36	36, 37	36, 37	37	37	37	37
DXS7423	14	13, 14	13, 14	13	13	15	13
Amelogenin	X, Y	X	X	X, Y	X, Y	X, Y	X, Y

is a brother of K. and the father of her child equalled 2.18 108. To further explore the relationships between the members of the family their ChrXs were typed. The results are presented in Table V. Each of the four sons of J. had different genotypes in the range of Argus X-8 loci and three of them – A., Kz. and Kr. – could be excluded as the father of Z., as could J himself. S. (the probable father) could not be excluded as the true father in the range of ChrX markers, which supported the hypothesis of biological paternity of S. in relation to Z.

The second case relates to a complicated paternity investigation of a child born to a juvenile mother (A., referred to henceforth as the victim) with severe mental and physical disabilities. There was a suspicion that one of her brothers or her father might be the father of the new-born child, because the woman had lived at home before the pregnancy. Furthermore, one of the victim's brothers (K.) had fled from the house, after he had found out about her pregnancy and was wanted by the Police as the main suspect. The child (female – X.) died just after birth. Blood samples of the new-born child, the victim, her parents and her two brothers were investigated with Identifiler kit (data not presented). After genetic analysis the father (M.) of the victim (A.) was excluded as the biological father of the child in question in four loci (D13S317, D19S433, D5S818 and FGA). Interestingly, he could also be excluded as the biological father of the victim in two loci (D7S820 and D2S1338). The victim's brother (J.) was excluded as the father of the child in five loci: D21S11, D7S820, D13S317, D19S433 and D5S818. Finally, the victim's brother K. was not excluded as the putative father of the new-born child at 14 STR loci; however, one in-

consistency did occur in the D5S818 locus. We assumed a mutation occurred in parental gametes, which led to exclusion in a single locus. The mutation rate for D5S818 was estimated at 0.12% for the paternal line (STRbase), which is relatively high [4]. The probability of the paternity of the alleged father was estimated according to the probabilities of the involved genotypes and the occurrence of the mutation event. The mutation assumption significantly reduced the value of the paternity index and therefore it was only about 2000 times more probable to obtain this result if the alleged father is the true father of the questioned child than obtaining the same result given that he is only the half brother of the victim. Hence, we performed a further investigation of ChrX markers. The results are presented in Table VI. Only the accused brother (K.) could not be excluded as the biological father of the child of A. The victim's other brother (J.) could be excluded in three ChrX loci and the father of the family (M.) in four loci. The results of ChrX STRs typing did not exclude the above mentioned brother K. as the biological father of the newborn, which supported the prosecutor's hypothesis.

4. Discussion and concluding remarks

The lack of statistically significant differences between male and female samples indicates that the overall population is homogenous with respect to alleles frequencies. Surprisingly, strong *HW* disequilibrium at one DXS7132 locus in parallel with a high degree of *HW* equilibrium in the rest of the tested loci was noted. This may be explained by the stochastic effect in con-

TABLE VI. RESULTS OF TYPING MEMBERS OF M.'S FAMILY WITH THE ARGUS X-8

STR	M. (family father)	C. (family's mother)	A (M. and C.' daughter)	X (daughter of A)	K (son of M. and C.)	J. (son of M. and C.)
DXS8378	10	10, 10	10, 10	10, 10	10	10
HPRTB	15	12, 13	12, 15	13, 15	13	12
DXS7423	14	14, 16	14, 16	14, 16	16	16
DXS7132	13	14, 15	13, 14	13, 15	15	15
DXS10134	34	36, 38	34, 38	34, 36	36	38
DXS10074	16	7, 18	16, 18	7, 16	7	7
DXS10101	32	31.2, 32	31.2, 32	32, 32	32	31.2
DXS10135	21.1	24, 24	21.1, 24	21.1, 24	24	24
Amelogenin	X, Y	X, X	X, X	X, X	X, Y	X, Y

nection with small sample size or by population specific mutations at the flanking region of this locus. The calculated values of *PIC*, *MEC* and *PD* indicate that the analysed set of Chr-X STRs is suitable for forensic analyses in our population.

Due to serious degradation processes which frequently affect human remains, bone and tooth material are biological specimens which may cause significant identification problems. Correct performance of a test when minimum amounts of DNA template are used is therefore crucial when genotyping human remains. Our experiments showed that the sensitivity and efficiency of the Argus X-8 is sufficient to analyse problematic forensic samples, e.g. bone material. The presented case is an example of potential application of ChrX-STR markers to forensic casework. It is clear that appropriate statistical tools need to be developed in forensic science which would enable evaluation of results obtained with different types of genetic markers and calculation of the combined likelihood ratios. Probabilistic expert systems which implement Bayes theory have the potential to enable such calculations in the future [9].

Because of the significant degree of kinship between individuals which occurs in incest cases, interpretation of results of paternity analysis can be very difficult. In some such cases, ChrX STRs may be superior to autosomal markers, particularly if two men suspected of paternity are father and son, hence they would not share any ChrX alleles identical by descent. We observed recombination events in each meiosis in the two examined mother-sons transmissions. This observation is in agreement with the statement by Szibor et al. [8] that the probability of a lack of crossing-over

events in two meioses equals approximately 0.135. Hence, the co-inheritance of two identical maternal ChrXs without recombination is not impossible, but rare. This implies that, for example, the daughter usually inherits only a partially matching haplotype from her mother, as is seen in analysis of haplotypes of J.'s family (Table V).

This study showed that Mentype Argus X-8 represents a set of additional markers which can be useful for forensic investigations in particular cases.

Acknowledgments

This project was funded by the Institute of Forensic Research in Krakow, Grant no. IVG/2007. The authors wish to thank Dominik Waluk, Magdalena Marcińska, and Andrzej Sekuła for their contribution to this work.

References

1. Del Mastro R. G., Farndon P. A., Kilpatrick M. W., A recombination map of the human X-chromosome, *Human Genetics* 1990, 86, 228–230.
2. Excoffier L., Laval G., Schneider S., Arlequin ver. 3.0. An integrated software package for population genetics data analysis, *Evolutionary Bioinformatics Online* 2005, 1, 47–50.
3. Mentype Argus X-8 PCR Amplification Kit, Manual, 2007.
4. Ruitberg C. M., Reeder D. J., Butler J. M., STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community, *Nucleic Acids Research* 2001, 29, 320–322.
5. Sokal R. R., Rohlf F. J., Biometry, W. H. Freeman and Company, San Francisco 1981.

6. Szibor R., X-chromosomal markers: Past, present and future, *Forensic Science International: Genetics* 2007, 1, 93–99.
7. Szibor R., Hering S., Edelman J., A new Web site compiling forensic chromosome X research is now online, *International Journal of Legal Medicine* 2006, 120, 252–254.
8. 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.
9. Wolańska-Nowak P., Branicki W., Zadora G. [et al.], Examples of combining genetic evidence – Bayesian network approach, *Forensic Science International: Genetics* [in press].

Corresponding author

Wojciech Branicki
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: wbranicki@ies.krakow.pl

ZASTOSOWANIE ZESTAWU MENTYPE ARGUS X-8 DO BADAŃ SĄDOWYCH

1. Wstęp

Badania nad pokrewieństwem prowadzone dla celów sądowych w niektórych przypadkach powodują poważne problemy interpretacyjne. Trudności mogą na przykład sprawiać sprawy dotyczące spornego ojcostwa, w których konieczne jest genetyczne zróżnicowanie osób o bliskim pokrewieństwie (np. dotyczące kazirodztwa), a także sprawy identyfikacji szczątków ludzkich, w których dostępny materiał porównawczy ograniczony jest do pojedynczego krewnego (np. ojca albo matki) lub pochodzi od dalszych krewnych. W takich przypadkach standardowo analizowane markery autosomalne często nie dają rezultatów pozwalających na jednoznaczną interpretację. Wprawdzie uzyskane wyniki badań genetycznych mogą przemawiać na korzyść hipotezy o pokrewieństwie pomiędzy badanymi osobami, ale niska wartość uzyskanego dowodu nie pozwala na wyciągnięcie wniosków, które nie budziłyby wątpliwości. W takich przypadkach zaleca się poszerzenie badań genetycznych o kolejne markery genetyczne. W zależności od rodzaju zakładanego pokrewieństwa pomiędzy badanymi osobami użyteczna może okazać się analiza markerów typu STR zlokalizowanych na chromosomie Y lub zmienność mitochondrialnego DNA. Markery typu STR zlokalizowane na chromosomie X stanowią dodatkowe cenne źródło polimorfizmu genetycznego i są stosowane analogicznie jak markery ChrY i mtDNA. W związku ze szczególnym sposobem dziedziczenia chromosomu X, analiza markerów ChrX może być użyteczna w sprawach spornego ojcostwa, gdy dostępny jest materiał porównawczy wyłącznie od jednego z rodziców oraz w niektórych przypadkach analizy pokrewieństwa [5]. Bez wątpienia, ich analiza może być szczególnie przydatna w sprawach, w których konieczne jest wykazanie pokrewieństwa pomiędzy ojcem a córką lub matką a synem. Jednak względnie wysokie tempo rekombinacji charakterystyczne dla chromosomu X może być powodem pewnych problemów interpretacyjnych w przypadkach, w których w grę wchodzi dziedziczenie chromosomu X w linii matka – syn [1]. Wszystkie córki dziedziczą zmienność charakterystyczną dla ojcowskiego chromosomu X w formie haplotypu, mimo to jednak w wyniku genotypowania ich DNA oznaczane są również dane genetyczne pochodzące z chromosomu X dziedziczonych po matce.

Zastosowanie dodatkowych markerów genetycznych bardzo często staje się konieczne w sprawach dotyczących identyfikacji szczątków ludzkich. W związku z tym, w badaniach o charakterze sądowym, pożądanym jest taki poziom czułości testu, który umożliwia analizę próbek

narażonych na silną degradację. Mentype Argus X-8 jest dostępnym w handlu zestawem, który pozwala na jednoczesną analizę ośmiu markerów genetycznych typu STR zlokalizowanych na chromosomie X oraz dodatkowo amelogeniny w charakterze markera płci. Analizowane *loci* typu STR skupione są w czterech grupach sprzężeń: 1) DXS10135 i DXS8378, 2) DXS7132 i DXS10074, 3) HPRTB i DXS10101, 4) DXS10134 i DXS7423.

Niniejsza praca przedstawia dane populacyjne dla markerów genetycznych zawartych w zestawie Mentype Argus X-8 uzyskane dla próby populacyjnej z Polski południowej. W pracy zaprezentowano również przypadki praktycznego zastosowania tych markerów do badań nad identyfikacją szczątków ludzkich oraz analizy spraw kazirodztwa. Dyskutowane są zalety oraz problemy związane z zastosowaniem *loci* ChX STR w charakterze sądowych markerów identyfikacyjnych.

2. Materiały i metody

2.1. Badana populacja

Badana populacja składała się z 204 niespokrewnionych mężczyzn ($n = 103$) i kobiet ($n = 101$) zamieszkujących obszar Polski południowej. Ekstrakcję DNA prowadzono z wymazów z jamy ustnej lub krwi obwodowej. Ocenę przydatności analizy *loci* ChrX-STR w złożonych sprawach dotyczących spornego ojcostwa prowadzono, korzystając z próbek pobranych w związku z dwoma sprawami sądowymi dotyczącymi kazirodztwa. W badaniach walidacyjnych wykorzystano również próbki kości badane uprzednio w charakterze materiału dowodowego w sprawach związanych z identyfikacją osób. W jednym z przypadków identyfikacji szczątków ludzkich, *loci* ChrX-STR zastosowano w charakterze dodatkowego markera genetycznego.

2.2. Genotypowanie

Ekstrakcję DNA z próbek populacyjnych oraz z próbek ze spraw sądowych (za wyjątkiem materiału kostnego) prowadzono z zastosowaniem magnetycznej metody izolacji i aparatu Biorobot M48 (Qiagen, Hilden, Niemcy). Stężenie DNA w badanych próbkach określano z zastosowaniem metody fluorymetrycznej, za pomocą aparatu Fluoroscanner Ascent FL (Labsystems, Helsinki, Finlandia). Ekstrakcję DNA z materiału kostnego dokonano, stosując metodę fenolowo-chloroformową i za-

gęszczanie próbek na kolumnkach Centricon 100. Do pomiaru stężenia DNA tych próbek stosowano zestaw Quantifiler Human DNA Quantitation Kit (Applied Biosystems, Foster City, Stany Zjednoczone). Reakcje PCR przygotowywano zgodnie z zaleceniami producenta zestawu Mentype Argus X-8 [3]. Jeśli było to możliwe, do reakcji amplifikacji dodawano 1–2 ng matrycy DNA. Całkowita objętość reakcji PCR wynosiła 15 μ l dla próbek populacyjnych oraz 25 μ l dla analizowanych próbek kości i innych próbek pochodzących ze spraw sądowych. W każdym przypadku stosowano 30 cykli reakcji PCR. Reakcje amplifikacji prowadzono z zastosowaniem aparatu GenAmp 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, Stany Zjednoczone). Produkty reakcji PCR rozdzielano na aparacie do elektroforezy kapilarnej ABI3100 Avant zgodnie z protokołem zalecanym przez producenta.

2.3. Analizy statystyczne

Częstości alleli dla mężczyzn i kobiet obliczono przy użyciu programu SPSS (www.spss.com). Do obliczenia oczekiwanej i obserwowanej heterozygotyczności (HET_{exp} , HET_{obs}) dla analizowanej grupy kobiet zastosowano program Arlequin 3.0 [2]. Program Arlequin zastosowano również do analizy równowagi Hardy'ego-Weinberga (HW) oraz nierównowagi sprzężeń pomiędzy analizowanymi *loci* Argus X-8. Wartości współczynników zawartości informacji polimorficznej (PIC), siły dyskryminacji (PD) oraz średniej szansy wykluczenia (MEC ; różne wzory) obliczono z zastosowaniem kalkulatora dostępnego na stronie internetowej www.chrx-str.org [7]. Różnice pomiędzy częstościami alleli dla analizowanych grup mężczyzn oraz kobiet oceniano za pomocą testu G (test oparty na ilorazie wiarygodności) z zastosowaniem oprogramowania stworzonego przez G. Carmody'ego [5].

3. Wyniki

3.1. Dane populacyjne

Przeprowadzone obliczenia z zastosowaniem testu G [5] nie wykazały statystycznie istotnych różnic pomiędzy częstościami alleli charakterystycznymi dla analizowanych populacji mężczyzn oraz kobiet. Łączne częstości alleli uzyskane dla ośmiu analizowanych *loci* Chr-X w próbie populacyjnej mężczyzn i kobiet zamieszkujących Polskę południową przedstawiono w tabeli I.

Obliczone parametry statystyczne opisujące użyteczność markerów w badaniach genetyczno-sądowych przedstawiono w tabeli II. Analizowane *loci*, za wyjątkiem jednego układu genetycznego, wykazały zgodność ze stanem równowagi HW . Odstępstwo od stanu rów-

nowagi HW stwierdzone dla *locus* DXS7132 było istotne statystycznie również po wprowadzeniu poprawki Bonferroniego do testów wielokrotnych ($p < 0,00625$). Analiza nierównowagi sprzężeń (LD) wykazała przypadkowy rozkład alleli w poszczególnych analizowanych *loci*. LD stwierdzona początkowo pomiędzy *loci* HPRTB-DXS7132 oraz DXS7132-DXS10134 okazała się nieistotna statystycznie po zastosowaniu korekty Bonferroniego do wielokrotnych porównań ($p > 0,00179$). W przypadku wszystkich badanych *loci* wartości współczynnika $MEC_{Koshida}$ (zaproponowanego dla markerów ChrX do analizy trójki z udziałem córki) są wyższe niż wartości współczynnika $MEC_{Kruenger}$ (wprowadzonego dla markerów autosomalnych do analizy trójek: matka, dziecko, domniemany ojciec). Może to wskazywać, że w przypadku trójek z udziałem córki, markery ChrX są bardziej efektywne od markerów autosomalnych (tabela II).

3.2. Zastosowanie zestawu Argus X-8 do spraw sądowych

3.2.1. Identyfikacja szczątków ludzkich

Analizie *loci* zawartych w zestawie Argus X-8 poddano dziesięć próbek kości o znacznym stopniu degradacji będących dowodami w prowadzonych uprzednio sprawach sądowych. W pięciu przypadkach uzyskano kompletne lub częściowe profile genetyczne w zakresie *loci* Argus X-8. Taki wynik jest zgodny z rezultatem uzyskanym uprzednio przy zastosowaniu zestawu Identifier (tabela III). Przeprowadzone badania wskazują zatem, że zestaw Argus X-8 posiada podobną czułość do zestawu Identifier i może być z powodzeniem stosowany do analizy materiału kostnego.

Przedstawiony przypadek dotyczy zastosowania zestawu Argus X-8 w celu identyfikacji znalezionej w lesie ciała o znacznym stopniu rozkładu. Zgodnie z hipotezą policji, zwłoki należały do zaginionego mężczyzny, a jedyny dostępny materiał porównawczy pochodził od jego córki. Stan próbek dowodowych pozwolił na uzyskanie kompletnego profilu DNA w zakresie *loci* wchodzących w skład zestawu Identifier, co nie pozwoliło jednak na uzyskanie wartości prawdopodobieństwa ojcostwa, która byłaby wystarczająca w świetle przyjętych w Polsce w tym względzie norm. Uzyskano wartość $LR = 43\ 000$ na korzyść hipotezy o pokrewieństwie typu ojciec-córka pomiędzy badanymi osobami, przez co wartość prawdopodobieństwa ojcostwa wyniosła 0,99998. W sprawie tej nie był użyteczny żaden inny dodatkowy marker genetyczny poza *loci* ChrX-STR. Wyniki uzyskane dzięki zastosowaniu zestawu Mentype Argus X-8 wsparły hipotezę o pokrewieństwie typu ojciec-córka pomiędzy badanymi osobami, gdyż w próbce porównawczej pochodzącej od domniemanej córki zaginionego

mężczyzny oznaczono kompletny haplotyp charakterystyczny dla ofiary (tabela IV).

3.2.2. Przykłady prób analizy złożonych przypadków kazirodztwa

Pierwsza z przedstawionych spraw badania ojcostwa dotyczyła przypadku urodzenia dziecka przez niepełnoletnią matkę (K.). Podejrzewano, że biologicznym ojcem dziecka może być ktoś blisko spokrewniony z jego matką. Ponieważ żaden z czterech braci matki dziecka ani jej ojciec nie przyznawali się do ojcostwa, prokurator zarządził pobranie materiału porównawczego od każdego z nich. Próbkę krwi pochodzącą od noworodka (Z.), matki (K.), jej ojca (J.) oraz czterech braci (S., A., Kz., Kr.) przebadano w zakresie *loci* zawartych w zestawie Identifiler (dane nieprezentowane). Otrzymane wyniki nie pozwoliły na wykluczenie jednego z braci (S.) ofiary jako ojca noworodka. Pozostali analizowani mężczyźni wykluczali się w co najmniej dwóch *loci*. Iloraz wiarygodności dla hipotezy zakładającej, że S. jest bratem K. oraz ojcem jej dziecka, osiągnął wartość 2,18 108. Dalsze badania pokrewieństwa pomiędzy członkami tej rodziny prowadzono z zastosowaniem markerów ChrX. Wyniki zebrano w tabeli V. Każdy z czterech synów J. posiadał inne genotypy w zakresie *loci* zawartych w zestawie Argus X-8. Dla trzech z nich (A., Kz., Kr.), podobnie jak dla samego J., należało wykluczyć biologiczne ojcostwo względem Z. Wyniki analizy zestawu markerów ChrX-STR uzyskane dla S. (prawdopodobny ojciec dziecka) nie pozwalały na jego wykluczenie jako biologicznego ojca noworodka, co podtrzymało hipotezę, że S. jest biologicznym ojcem Z.

Druga z przedstawionych spraw dotyczyła złożonego przypadku ustalania ojcostwa względem dziecka, które urodziła pewna niepełnoletnia matka (A., nazywana dalej ofiarą) o znacznym upośledzeniu fizycznym i umysłowym. Ponieważ dziewczyna pozostawała w domu przed zajściem w ciążę, podejrzewano, że biologicznym ojcem dziecka jest jeden z jej braci lub ojciec. Dodatkowo jeden z braci ofiary (K.) zbiegł z domu po tym, jak wyszło na jaw, że dziewczyna jest w ciąży. Policja rozpoczęła jego poszukiwania jako głównego podejrzanego w sprawie. Dziecko (dziewczynka – X.) zmarło zaraz po urodzeniu. Badaniom genetycznym z zastosowaniem zestawu Identifiler poddano próbki krwi pobrane od noworodka, ofiary, rodziców ofiary oraz jej dwóch braci (dane nieprezentowane). Wyniki badań pozwoliły na wykluczenie biologicznego ojcostwa względem dziecka X. w przypadku ojca (M.) ofiary (A.); niezgodność odnotowano bowiem w przypadku czterech *loci* genetycznych (D13S317, D19S433, D5S818 i FGA). Co ciekawe, wyniki uzyskane dla dwóch *loci* (D7S820 oraz D2S1338) wykazały, że nie jest on również biologicznym ojcem samej ofiary. Na podstawie wyników uzyskanych dla pię-

ciu *loci* genetycznych (D21S11, D7S820, D13S317, D19S433 i D5S818) wykluczono również ojcostwo względem jej dziecka w przypadku jednego z braci ofiary (J.). Ostatecznie nie wykluczono ojcostwa względem noworodka w przypadku drugiego z braci ofiary (K.) po przeanalizowaniu wyników dla 14 *loci* typu STR. Niezgodność odnotowano jednak w 15 *locus* – D5S818. Założono, że doszło do mutacji w męskich komórkach gametycznych, która wskazywała na wykluczenie w pojedynczym *locus*. Przyjęto, że tempo mutacji dla *locus* D5S818 w linii ojcowskiej wynosi 0,12% (STRbase) [4], a więc jest względnie wysokie. Prawdopodobieństwo ojcostwa domniemanego ojca oszacowano na podstawie prawdopodobieństw poszczególnych genotypów przy uwzględnieniu mutacji. Hipoteza zajścia mutacji znacznie obniżyła łączną wartość współczynnika ojcostwa, wobec czego ustalono, że otrzymanie określonych wyników analizy genetycznej trójki osób jest zaledwie około 2000 razy bardziej prawdopodobne przy założeniu, że pozwany jest biologicznym ojcem badanego dziecka, niż gdy pozwany jest wyłącznie przyrodnim bratem ofiary. Badania poszerzono poprzez zastosowanie markerów ChrX. Wyniki tych analiz przedstawiono w tabeli VI. Jedynie oskarżony brat ofiary (K.) nie mógł zostać wykluczony jako biologiczny ojciec dziecka A. Drugiego z braci ofiary (J.) wykluczono na podstawie wyników uzyskanych dla trzech *loci* ChrX, a ojca rodziny (M.) na podstawie analizy czterech *loci*. Wyniki genotypowania *loci* ChrX STR nie pozwoliły na wykluczenie brata K. jako biologicznego ojca noworodka, co dodatkowo wzmacniło hipotezę oskarżenia.

4. Dyskusja i uwagi końcowe

Brak statystycznie istotnych różnic w rozkładzie częstości alleli pomiędzy analizowanymi grupami mężczyzn i kobiet wskazuje na homogenność całej badanej populacji. Nieoczekiwanie odnotowano silne odstępstwo od reguły Hardy'ego-Weinberga w przypadku jednego z badanych *loci* (DXS7132) przy równoczesnej równowadze HW dla reszty badanych *loci*. Zjawisko to można wyjaśnić efektem stochastycznym w połączeniu z małymi rozmiarami badanej próby lub specyficznymi dla badanej populacji mutacjami w regionach flankujących tego *locus* genetycznego. Obliczone wartości PIC, MEC oraz PD wskazują, że analizowany zestaw *loci* ChrX STR nadaje się do badań sądowych polskiej populacji.

W związku z silnymi procesami degradacji, które mogą niszczyć DNA zawarty w szczątkach ludzkich, kości oraz zęby to takie próbki biologiczne, które mogą sprawiać poważne problemy identyfikacyjne. Dlatego konieczne jest prawidłowe działanie testów stosowanych do analizy genetycznej szczątków ludzkich przy minimalnych ilościach matrycowego DNA. Przeprowadzone

doświadczenia wykazały, że czułość i wydajność zestawu Argus X-8 są wystarczające do analizy trudnych próbek biologicznych, np. materiału kostnego. Przedstawiony przypadek analizy kości stanowi przykład możliwości zastosowania markerów ChrX-STR do spraw sądowych. Bez wątpienia w naukach sądowych potrzebne są odpowiednie narzędzia statystyczne, które umożliwiłyby ocenę wartości wyników uzyskanych dzięki analizie różnego typu markerów genetycznych i szacowanie łącznych ilorazów wiarygodności. Możliwe, że takie obliczenia będą mogły być prowadzone w przyszłości z zastosowaniem probabilistycznych systemów ekspertowskich, które polegają na zastosowaniu teorii Bayesa [9]. W sprawach dotyczących kazirodztwa interpretacja wyników analizy ojcostwa może sprawiać poważne trudności wynikające z wysokiego stopnia pokrewieństwa pomiędzy badanymi osobami. W niektórych tego typu sprawach analiza *loci* ChrX STR może być bardziej korzystna niż analiza *loci* markerów autosomalnych. Szczególnie dotyczy to przypadków, gdy dwaj mężczyźni podejrzewani o ojcostwo są spokrewnieni ze sobą w linii ojciec-syn, a więc nie posiadają żadnych alleli ChrX o wspólnym pochodzeniu. W dwóch analizowanych przypadkach dziedziczenia chromosomu X w linii matka-synowie zaobserwowano przypadki rekombinacji w każdej mejozie. Obserwacja ta jest zgodna z danymi prezentowanymi przez Szibor i in. [8], którzy twierdzą, że prawdopodobieństwo braku zjawiska *crossing-over* w dwóch mejozach wynosi około 0,135. Zatem wspólne odziedziczenie dwóch identycznych matczynych ChrX, dla których nie doszłoby do rekombinacji genetycznej, nie jest niemożliwe, ale rzadkie. Wskazuje to, że jak wynika z analizy haplotypów charakterystycznych dla rodziny J., córka zazwyczaj dziedziczy haplotyp tylko częściowo zgodny z jednym z haplotypów charakterystycznych dla matki (tabela V).

Przeprowadzone badania wykazały, że zestaw Mente Argus X-8 zawiera panel *loci*, które w niektórych przypadkach mogą być użyteczne jako dodatkowe markery genetyczne w badaniach o charakterze sądowym.

Podziękowania

Projekt został zrealizowany w ramach tematu badawczego o numerze IVG/2007 finansowanego przez Instytut Ekspertyz Sądowych w Krakowie. Autorzy wyrażają podziękowania Dominikowi Walukowi, Magdalenie Marcińskiej oraz Andrzejowi Sekule za ich wkład w przeprowadzenie badań.