

Krzysztof Rębała, Iosif S. Tsybovsky<sup>1</sup>, Alexei I. Mikulich<sup>2</sup>, Zofia Szczerkowska

## Identyfikacja polimorfizmu typu Y-SNP w genie USP9Y i jego znaczenie w genotypowaniu alleli locus M46

Identification of a novel Y-SNP in the USP9Y gene and its impact on genotyping alleles of the M46 locus

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
Kierownik: dr hab. med. Z. Jankowski

<sup>1</sup> Z Centrum Ekspertyz Sądowych i Kryminalistyki, Mińsk, Białoruś

<sup>2</sup> Z Zakładu Antropologii i Ekologii Instytutu Historii Narodowej Akademii Nauk, Mińsk, Białoruś

Markery SNP chromosomu Y skupiają coraz większe zainteresowanie genetyków sądowych, jednak z uwagi na fakt, że stanowią one warianty charakterystyczne dla pochodzenia etnicznego, konieczne są bardzo szczegółowe badania populacyjne. W toku badań nad częstością haplogrupy N-M46 w populacji białoruskiej allel zmutowany zaobserwowano u 22 mężczyzn, spośród których jeden wyróżnił się nietypowym układem alleli Y-STR. Sekwencjonowanie locus M46 tego mężczyzny wykazało obecność nowego, nieopisanego dotąd polimorfizmu Y-SNP w pobliżu locus M46, który odpowiadał za błędne przypisanie do haplogrupy N-M46. W pracy omówiono wpływ tego polimorfizmu na genotypowanie alleli locus M46 różnymi metodami oraz zaproponowano rozwiązania zapewniające poprawność uzyskiwanych wyników.

Y-chromosomal SNP markers are becoming increasingly more popular among forensic geneticists, but since they constitute variants specific to the ethnic origin, detailed population studies are required. Research into frequency of haplogroup N-M46 in the Belarusian population detected a mutated allele in 22 males, including one with a very distinct Y-STR haplotype. Sequencing of the M46 locus of this individual revealed the presence of a novel Y-SNP nearby the M46 locus, which was responsible for the erroneous assignment of the Y chromosome to the haplogroup N-M46. An impact of the identified polymorphism on discrimination of alleles of the M46 locus with various techniques was discussed, and solutions ensuring correctness of the genotyping results were proposed.

Słowa kluczowe:

chromosom Y, polimorfizm SNP,  
haplogrupa N-M46, populacja białoruska

Key words:

Y chromosome,  
single nucleotide polymorphism,  
haplogroup N-M46, Belarusian population

### WSTĘP

Markery sprzężone z chromosomem Y stosowane są w wykrywaniu i różnicowaniu materiału genetycznego pochodzącego od mężczyzn [1] w śladach biologicznych zawierających mieszaninę DNA osób obu płci, często spotykanych w przypadku przestępstw na tle seksualnym. Wykorzystuje się je również w ustalaniu pokrewieństwa między mężczyznami, w tym w dochodzeniu spornego ojcostwa, kiedy domniemany ojciec jest nieosiągalny i możliwa jest analiza DNA jego krewnych w linii męskiej. Spośród licznych markerów zlokalizowanych na tym chromosomie, największe zastosowanie w praktyce medyczno-sądowej znalazły markery mikrosatelitarne, jednakże uwaga genetyków sądowych coraz bardziej zwraca się w stronę polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP). Jako że ogromna większość markerów typu SNP jest efektem pojedynczej mutacji punktowej, która zaszła w czasie ewolucji gatunku ludzkiego, chromosomy Y o identycznej mutacji punktowej zazwyczaj mają wspólne pochodzenie i określane są mianem haplogrupy. Mimo stosunkowo niskiej siły dyskryminacji markery typu Y-SNP stanowią wartościowy i prosty w uzy-

skaniu i interpretacji dowód wykluczenia pokrewieństwa porównywanych osób lub popełnienia przestępstwa przez podejrzanego w sprawie karnej. Wielką zaletą analizy markerów SNP jest możliwość detekcji dużo mniejszych fragmentów DNA, co znajduje zastosowanie w przypadku silnego zdegradowania materiału biologicznego [2]. Haplogrupy chromosomu Y definiowane przez markery typu SNP nie są przypadkowo rozmieszczone wśród populacji ludzkich, stanowiąc warianty charakterystyczne dla pochodzenia etnicznego, co w genetyce sądowej znajduje potencjalne zastosowanie, np. w przewidywaniu pochodzenia sprawcy przestępstwa [1].

Jedną z haplogrup częściej oznaczanych w populacjach europejskich jest haplogrupa N-M46, którą charakteryzuje polimorfizm markera M46 (znanego również jako Tat lub rs34442126), zlokalizowanego w intronie 28 genu USP9Y (proteazy specyficznej dla ubikwityny 9) w locus Yq11.21 w postaci tranzycji USP9Y g.101203T>C. Mutacja ta pojawiła się przypuszczalnie ok. 12 000 lat temu w północnych Chinach, skąd rozprzestrzeniła się na całą północną Eurazję. W Europie z dużą częstością występuje w północno-wschodniej części kontynentu wśród ludów ugrofińskich i bałtyckich [3]. W Polsce należy do niej ok. 4% mężczyzn [4]. Jako że haplogrupa N-M46 występuje z dużą częstością w populacjach ugrofińskich i bałtyckich, zaś jest znacznie rzadsza u Słowian [5], stanowi ona potencjalny marker substratu ugrofińskiego i bałtyckiego w populacjach słowiańskich.

Metodą często stosowaną w genotypowaniu alleli locus M46 jest technika PCR-RFLP. Polega ona na amplifikacji fragmentu DNA obejmującego badany polimorfizm przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) i trawieniu produktu amplifikacji enzymem restrykcyjnym Hsp92II lub jego izoschimerem NlaIII, które specyficznie rozpoznają i tną sekwencję CATG, charakterystyczną dla allelu niezmutowanego M46\*T. Sekwencja CACT, obecna w przypadku allelu zmutowanego M46\*C, nie jest rozpoznawana przez wspomniane enzymy i pozostaje nietknięta, co w badaniach populacyjnych uwidacznia się jako polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) [4].

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowił DNA pochodzący od

196 niespokrewnionych mężczyzn z populacji białoruskiej [5]. Allele locus M46 genotypowano metodą PCR-RFLP z użyciem starterów opisanych w pracy Kaysera i wsp. [4] oraz endonukleazy Hsp92II. Produkty trawienia rozdzielano elektroforetycznie w żelach poliakrylamidowych i barwiono srebrem. Dodatkowo u badanych osób oznaczono polimorfizm 22 loci Y-STR: DYS19, DYS388, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS426, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS460, DYS635, GATA H4.1, DYS385 a/b, YCAII a/b [5, 6]. Jednokrokowe mutacje dzielące poszczególne haplotypy przedstawiono graficznie w oparciu o program komputerowy NETWORK 4.6 (Fluxus Technology), obliczając sieć typu „*median-joining network*”. System DYS389 analizowano jako dwa niezależne loci: DYS389I i DYS389II-I, zaś w przypadku systemów DYS385 i YCAII allele przypisano różnym loci w zależności od wielkości allelu. Wybrane produkty PCR oczyszczono i poddano sekwencjonowaniu zgodnie z wcześniej opisaną procedurą [7], zaś uzyskane sekwencje porównano z sekwencją referencyjną NC\_000024, zdeponowaną w internetowej bazie danych amerykańskiego Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (NCBI). Przynależność haplogrupową badanego haplotypu Y-STR określono przy użyciu bayesowskiego algorytmu wykorzystującego różnice w częstościach alleli w poszczególnych haplogrupach [8].

## WYNIKI

Na 196 mężczyzn z populacji białoruskiej, u których oznaczono polimorfizm locus M46 metodą PCR-RFLP, w przypadku 22 próbek DNA (11,2%) produkt PCR nie ulegał trawieniu przez restryktazę Hsp92II, co sugerowało obecność allelu zmutowanego M46\*C i przynależność do haplogrupy N-M46. Analiza wyników genotypowania markerów mikrosatelitarnych chromosomu Y wykazała jednak, iż jeden ze wspomnianych mężczyzn, pochodzący z rejonu Połocka w północnej Białorusi, wyróżniał się nietypowym układem alleli Y-STR, wyraźnie odległym od haplotypów pozostałych mężczyzn. Przykładowo wszyscy badani mężczyźni z haplogrupy N-M46 posiadali identyczne allele w systemie YCAII (YCAII\*18,20), który to system charakteryzuje się niską częstością mutacji [9], podczas gdy

wyróżniający się chromosom Y posiadał w tym systemie allele YCAII\*21,21 (tabela 1). Wyjątkowy zestaw alleli Y-STR u wspomnianego mężczyzny z haplogrupy N-M46 potwierdziła również sieć typu „median-joining network“ (ryc. 1).

Locus M46 tego mężczyzny poddano sekwencjonowaniu, które wykazało allel niezmutowany M46\*T i wykluczyło przynależność badanego chromosomu do haplogrupy N-M46. Stwierdzono u niego natomiast nowy, nieopisany dotąd polimorfizm w pobliżu locus M46 w miejscu rozpoznawanym przez enzym Hsp92II w postaci transwersji USP9Y g.101201C>G. Polimorfizm ten tworzy w miejscu restrykcyjnym sekwencję GATG nierozpoznawaną przez enzym, co skutkowało brakiem trawienia

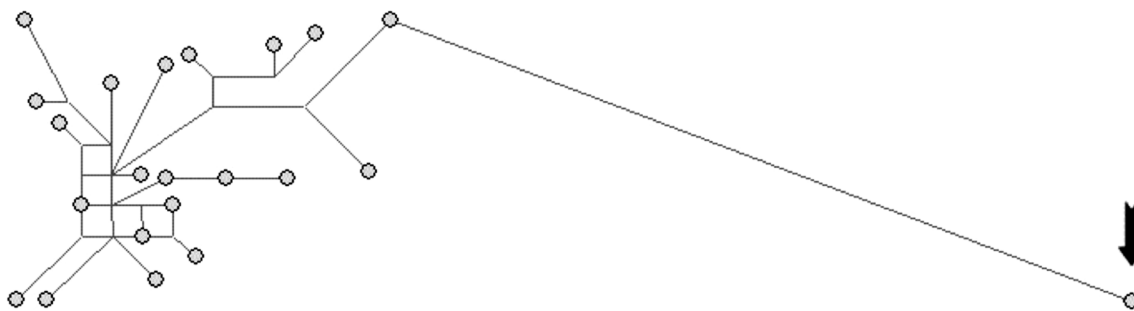
i błędnym przypisaniem do haplogrupy N-M46.

Analiza występowania alleli Y-STR oznaczonych u badanego mężczyzny w różnych haplogrupach wykazała, iż mężczyzna ten z prawdopodobieństwem wyliczonym metodą bayesowską równym 100,0% należy do haplogrupy I-P37.2\*(xM26). W związku z tym rzeczywista częstość haplogrupy N-M46 wśród 196 badanych Białorusinów była nieco niższa, niż wskazywały to wyniki analizy PCR-RFLP, i wynosiła 10,7%. Jako że badana osoba pochodziła z północnej Białorusi, rzeczywista częstość tej haplogrupy wśród 53 mężczyzn z tego regionu wynosiła 17,0%, nie zaś 18,9%, jak sugerowały to wcześniejsze doniesienia [5].

Tabela 1. Haplotypy Y-STR 22 mężczyzn z populacji białoruskiej, u których nie stwierdzono trawienia locus M46 enzymem restrykcyjnym Hsp92II.

Table 1. Y-STR haplotypes of 22 males from the Belarusian population, for which no digestion of the M46 locus with Hsp92II restriction enzyme was observed.

Lp.	DYS 19	DYS 388	DYS 389I	DYS 389II-I	DYS 390	DYS 391	DYS 392	DYS 393	DYS 426	DYS 437	DYS 438	DYS 439	DYS 448	DYS 456	DYS 458	DYS 460	DYS 635	GATA H4.1	DYS 385	YCAII
1.	14	12	13	15	23	11	14	13	11	14	10	10	19	14	17	12	21	21	11,13	18,20
2.	14	12	13	16	23	11	14	14	11	14	10	10	19	14	17	11	22	21	11,13	18,20
3.	14	12	13	16	24	10	14	13	11	14	10	10	19	16	16	11	23	21	11,15	18,20
4.	14	12	14	16	23	11	14	14	11	14	10	10	19	14	19	11	22	21	11,13	18,20
5.	14	12	14	18	24	11	14	13	11	14	10	10	19	16	16	11	23	20	11,13	18,20
6.	15	11	13	16	23	12	14	14	11	14	10	10	19	14	17	11	21	21	11,13	18,20
7.	15	12	13	16	23	10	14	14	11	14	10	10	19	14	17	11	21	21	11,11	18,20
8.	15	12	13	16	23	11	14	14	11	14	10	10	19	13	17	12	22	21	11,13	18,20
9.	15	12	13	16	23	11	14	14	11	14	10	10	19	14	17	11	21	21	11,14	18,20
10.	15	12	13	16	23	11	14	14	11	14	10	10	19	14	17	11	22	20	11,14	18,20
11.	15	12	13	16	23	11	14	14	11	14	10	10	19	14	18	11	21	20	11,14	18,20
12.	15	12	14	16	23	11	14	13	11	14	10	10	19	14	17	11	22	21	11,13	18,20
13.	15	12	14	16	23	11	14	14	11	14	10	10	19	14	18	11	22	22	10,13	18,20
14.	15	12	14	16	23	11	14	14	11	14	10	10	20	15	16	12	24	21	11,14	18,20
15.	15	12	14	16	23	11	14	14	11	14	10	10	20	16	15	11	23	21	11,13	18,20
16.	15	12	14	16	23	11	14	14	11	14	10	10	20	17	16	12	23	21	11,14	18,20
17.	15	12	14	16	23	11	14	14	11	14	10	11	19	13	17	12	22	21	11,13	18,20
18.	15	12	14	16	23	11	15	14	11	14	10	10	19	13	18	10	22	21	11,13	18,20
19.	15	12	14	16	24	10	14	14	11	14	10	10	19	13	18	10	21	21	11,13	18,20
20.	15	12	14	17	23	10	14	15	11	14	10	10	19	13	17	11	22	21	11,13	18,20
21.	15	12	14	17	23	11	14	14	11	14	10	11	19	13	17	12	23	21	11,13	18,20
22.	17	13	13	19	24	10	11	13	11	15	10	12	20	15	18	10	23	20	11,15	21,21



Ryc. 1. Sieć typu „median-joining network” haplotypów obejmujących 22 loci Y-STR, oznaczone u 22 mężczyzn z populacji białoruskiej, u których nie stwierdzono trawienia locus M46 enzymem restrykcyjnym Hsp92II. Strzałka wskazuje mężczyznę o nietypowym układzie alleli Y-STR.

Fig. 1. Median-joining network of haplotypes involving 22 Y-STR loci, genotyped in 22 males from the Belarusian population, in which no digestion of the M46 locus with Hsp92II restriction enzyme was observed. An arrow indicates an individual with a distinct Y-STR haplotype.

## DYSKUSJA

Spośród 196 badanych osób z populacji białoruskiej nowo zidentyfikowany polimorfizm Y-SNP zaobserwowano zaledwie u jednego mężczyzny (0,5%), zatem faktyczna częstość tego wariantu u Białorusinów w badaniach populacyjnych na większą skalę może okazać się bardzo niewielka. Polimorfizm ten może okazać się częstszy w populacjach, w których z dużą częstością występuje haplogrupa I-P37.2\*(xM26), jednak potwierdzenie tego wymaga dodatkowych badań.

Mimo że częstość tego polimorfizmu w różnych populacjach europejskich pozostaje nieznaną, wyniki naszych badań wskazują, że może on być przyczyną błędów w oznaczaniu haplogrupy N-M46 przy użyciu opisanej w niniejszej pracy, często stosowanej metody PCR-RFLP z użyciem enzymów restrykcyjnych Hsp92II lub NlaIII. Problem ten w prosty sposób eliminuje weryfikacja obecności allelu zmutowanego M46\*C poprzez trawienie restryktazą Maell, rozpoznającą sekwencję ACGT [10] (dla allelu niezmutowanego M46\*T charakterystyczna jest sekwencja ATGT, nierozpoznawana przez ten enzym).

Polimorfizm ten może również utrudniać dyskryminację alleli locus M46 w przypadku coraz bardziej popularnej techniki opartej na reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qPCR), np. z użyciem sond

TaqMan. Miejsce polimorficzne wykrywane przez taką sondę zazwyczaj umiejscowione jest w środkowej części sondy i dodatkowy polimorfizm SNP w pobliżu badanego miejsca może obniżyć wydajność wiązania się sondy do rozpoznawanej sekwencji i utrudniać oznaczenie genotypu.

W celu zapobieżenia błędom w genotypowaniu alleli locus M46 przydatne może być jednoczesne oznaczanie innych markerów Y-SNP, które potwierdzają pozycję badanego chromosomu Y na drzewie filogenetycznym, np. LLY22g, ponieważ wszyscy mężczyźni z haplogrupy N-M46 posiadają również zmutowany allel w tym markerze [11]. W naszym przypadku w wykryciu błędu w genotypowaniu pomocne byłoby również np. oznaczenie markera P37.2, jako że opisany w niniejszej pracy chromosom Y najprawdopodobniej należy do haplogrupy I-P37.2\*(xM26). Marker M46 można również w przyszłości zastąpić markerem P105, gdyż mutacje w obu markerach obserwowane są zawsze razem [11]. Genotypowanie alleli locus P105 (zamiast locus M46) coraz częściej wykorzystywane jest w badaniach populacyjnych [12].

Innym rozwiązaniem, które zastosowano w niniejszym przypadku, jest dodatkowe oznaczenie haplotypu Y-STR w celu oszacowania przynależności haplogrupowej badanego mężczyzny przy użyciu dostępnych algorytmów [8, 13]. Na przydatność zależności pomiędzy przynależnością haplogrupową



a haplotypem Y-STR w kontroli poprawności analiz genetycznych w medycynie sądowej zwrócili uwagę Woźniak i wsp. [14].

Nasze badania wykazały częstość haplogrupy N-M46 w populacji białoruskiej na poziomie 10,7% i są w zgodzie z wynikami badań Kushniarevich i wsp. [15] na grupie 574 Białorusinów, wśród których do haplogrupy tej należało 9,6% badanych mężczyzn. Również wyższą częstość tej haplogrupy w północnej Białorusi (17,0%) w stosunku do środkowej i południowej części kraju (odpo-

wiednio 8,8% i 8,1%) [5] potwierdzają wyniki badań wspomnianych autorów [15], którzy zaobserwowali najwyższą częstość tej haplogrupy w północnej i zachodniej Białorusi w dorzeczu Dźwiny i Niemna (odpowiednio 14,7% i 12,0%), a więc w regionach graniczących z Łotwą i Litwą, krajami zamieszkanymi przez ludność mówiącą językami bałtyckimi. Potwierdza to przydatność haplogrupy N-M46 jako markera substratu bałtyckiego w populacjach słowiańskich.

## PIŚMIENNICTWO

1. Jobling M. A.: Y-chromosomal SNP haplotype diversity in forensic analysis. *Forensic Sci. Int.* 2001, 118: 158-162.

2. Bąbol-Pokora K., Prośniak A., Jacewicz R., Berent J.: Przydatność markerów SNP do analiz materiału biologicznego o wysokim stopniu degradacji. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 2009, 59: 118-123.

3. Rootsi S., Zhivotovsky L. A., Baldovič M., Kayser M., Kutuev I. A., Khusainova R., Bermisheva M. A., Gubina M., Fedorova S. A., Ilumäe A. M., Khusnutdinova E. K., Voevoda M. I., Osipova L. P., Stoneking M., Lin A. A., Ferak V., Parik J., Kivisild T., Underhill P. A., Villems R.: A counter-clockwise northern route of the Y-chromosome haplogroup N from Southeast Asia towards Europe. *Eur. J. Hum. Genet.* 2007, 15: 204-211.

4. Kayser M., Lao O., Anslinger K., Augustin C., Barger G., Edelman J., Elias S., Heinrich M., Henke J., Henke L., Hohoff C., Illing A., Jonkisz A., Kuzniar P., Lebioda A., Lessig R., Lewicki S., Maciejewska A., Monies D. M., Pawłowski R., Poetsch M., Schmid D., Schmidt U., Schneider P. M., Stradmann-Bellinghausen B., Szibor R., Wegener R., Wozniak M., Zoledziwska M., Roewer L., Dobosz T., Ploski R.: Significant genetic differentiation between Poland and Germany follows present-day political borders, as revealed by Y-chromosome analysis. *Hum. Genet.* 2005, 117: 428-443.

5. Rębała K., Mikulich A. I., Tsybovsky I. S., Siváková D., Džupinková Z., Szczerkowska-Dobosz A., Szczerkowska Z.: Y-STR variation among Slavs:

evidence for the Slavic homeland in the middle Dnieper basin. *J. Hum. Genet.* 2007, 52: 406-414.

6. Rębała K., Tsybovsky I. S., Bogacheva A. V., Kotova S. A., Mikulich A. I., Szczerkowska Z.: Forensic analysis of polymorphism and regional stratification of Y-chromosomal microsatellites in Belarus. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2011, 5: e17-e20.

7. Rębała K., Szczerkowska Z.: Identyfikacja bardzo krótkiego allela YCAII w populacji północnej Polski. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 2004, 54: 17-24.

8. Athey T. W.: Haplogroup prediction from Y-STR values using an allele-frequency approach. *J. Genet. Geneal.* 2006, 2: 34-39.

9. Quintana-Murci L., Semino O., Poloni E. S., Liu A., van Gijn M., Passarino G., Brega A., Nasidze I. S., Maccioni L., Cossu G., Al-Zahery N., Kidd J. R., Kidd K. K., Santachiara-Benerecetti A. S.: Y-chromosome specific YCAII, DYS19 and YAP polymorphisms in human populations: a comparative study. *Ann. Hum. Genet.* 1999, 63: 153-166.

10. Zerjal T., Dashnyam B., Pandya A., Kayser M., Roewer L., Santos F. R., Schiefenhövel W., Fretwell N., Jobling M. A., Harihara S., Shimizu K., Semjidmaa D., Sajantila A., Salo P., Crawford M. H., Ginter E. K., Evgrafov O. V., Tyler-Smith C.: Genetic relationships of Asians and Northern Europeans, revealed by Y-chromosomal DNA analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 1997, 60: 1174-1183.

11. Karafet T. M., Mendez F. L., Meilerman M. B., Underhill P. A., Zegura S. L., Hammer M. F.: New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Res.* 2008, 18: 830-838.

12. Martínez-Cruz B., Ziegle J., Sanz P., Sotelo G., Anglada R., Plaza S., Comas D., Genographic Consortium: Multiplex single-nucleotide polymorphism typing of the human Y chromosome using TaqMan probes. *Investig. Genet.* 2011, 2: 13.
13. Schlecht J., Kaplan M. E., Barnard K., Karafet T., Hammer M. F., Merchant N. C.: Machine-learning approaches for classifying haplogroup from Y chromosome STR data. *PLoS Comput. Biol.* 2008, 4: e1000093.
14. Woźniak M., Grzybowski T., Starzyński J., Papuga M., Stopińska K., Łuczak S.: Zależności pomiędzy przynależnością haplogrupową a haplotypem Y-STR jako potencjalny element kontroli poprawności analiz w medycynie sądowej. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 2006, 56: 155-164.
15. Kushniarevich A. I., Sivitskaya L. N., Danilenko N. G., Kozhukh G. K., Tsybovsky I. S., Villems R., Davydenko O. G.: Y chromosome gene pool of Belarusians – clues from biallelic markers study. *Dokl. Nac. Akad. Nauk Belarusi.* 2007, 51: 100-105.

Adres do korespondencji:  
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
ul. Dębowa 23  
80-204 Gdańsk  
k.rebala@gumed.edu.pl