

KRZYSZTOF RĘBAŁA

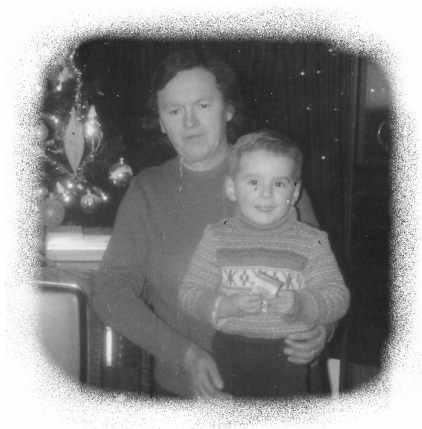
**ANALIZA POLIMORFIZMU 18 LOCI STR CHROMOSOMU Y
METODĄ KOMPLEKSOWEJ REAKCJI PCR.
BADANIA POPULACYJNE I ZASTOSOWANIE
W USTALANIU POKREWIEŃSTWA**

(rozprawa doktorska)

**Z Katedry i Zakładu
Medycyny Sądowej
Akademii Medycznej
w Gdańsku**

**Promotor:
prof. dr hab. Zofia Szczerkowska**

Gdańsk 2006



*P a m i ę c i t y c h ,
którym tak wiele zawdzięczam...*

Pragnę wyrazić niezmierną wdzięczność
Pani prof. Zofii Szczerkowskiej
za życzliwość, cierpliwość i nieocenioną pomoc
przy wykonywaniu i opracowywaniu niniejszej pracy
oraz koleżankom i kolegom z pracy
za wsparcie i wyrozumiałość

SPIS TREŚCI

SKRÓTY	4
1. WSTĘP	6
1.1. POLIMORFIZM DNA	6
1.2. REAKCJA ŁAŃCUCHOWA POLIMERAZY	8
1.2.1. Artefakty powstające w czasie reakcji PCR	11
1.3. TECHNIKI ROZDZIAŁU, DETEKCJI I TYPOWANIA ALLELI STR	12
1.3.1. Elektroforeza żelowa	12
1.3.2. Elektroforeza kapilarna	14
1.3.3. Artefakty towarzyszące metodom detekcji opartym na znakowaniu fluorescencyjnym różnymi barwnikami	16
1.3.4. Inne metody typowania alleli STR	16
1.4. LUDZKI CHROMOSOM Y	18
1.4.1. Systemy kompleksowej reakcji PCR w analizie polimorfizmu loci Y-STR	20
1.4.2. Znaczenie badań populacyjnych polimorfizmu chromosomu Y w genetyce sądowej	21
1.4.3. Badania populacyjne polimorfizmu chromosomu Y w antropologii	22
1.5. POPULACJE SŁOWIAŃSKIE	23
1.6. CHARAKTERYSTYKA BADANYCH LOCI Y-STR	24
2. CELE PRACY	29
3. MATERIAŁY	30
3.1. MATERIAŁ BIOLOGICZNY	30
3.2. ODCZYNNIKI	31
3.2.1. Zestawy odczynnikowe	31
3.3. SKŁAD ROZTWORÓW	32
3.4. PROGRAMY KOMPUTEROWE I INTERNETOWE BAZY DANYCH	32
4. METODY	33
4.1. IZOLACJA DNA	33
4.1.1. Izolacja DNA z krwi obwodowej	33
4.1.2. Izolacja DNA z nabłonka jamy ustnej	33
4.1.3. Elucja DNA z żelu poliakrylamidowego	34

4.2. OZNACZANIE STĘŻENIA DNA	34
4.2.1. Metoda fluorymetryczna	34
4.2.2. Metoda spektrofotometryczna	35
4.3. ROZPUSZCZANIE LIOFILIZOWANYCH STARTERÓW	35
4.4. REAKCJA PCR	35
4.5. REAKCJA SEKWENCJONOWANIA	38
4.6. PRECYPITACJA PRODUKTÓW SEKWENCJONOWANIA	38
4.6.1. Precypitacja izopropanolem	38
4.6.2. Precypitacja 59% etanolem w obecności octanu sodu	38
4.6.3. Precypitacja 66% etanolem w obecności octanu sodu	39
4.7. ELEKTROFOREZA KAPILARNA	39
4.7.1. Elektroforeza kapilarna produktów amplifikacji	39
4.7.2. Elektroforeza kapilarna produktów sekwencjonowania	39
4.8. TWORZENIE PLIKU MACIERZY DO ANALIZY WIELOBARWNIKOWEJ	40
4.9. ANALIZA WYNIKÓW ELEKTROFOREZY KAPILARNEJ	40
4.9.1. Analiza wyników genotypowania	40
4.9.2. Analiza wyników sekwencjonowania	41
4.10. ELEKTROFOREZA POLIAKRYLAMIDOWA I BARWIENIE DNA SREBREM	41
4.11. KONSTRUKCJA DRABINY ALLELI	42
4.12. KONTROLA JAKOŚCI	42
4.13. KOMPUTEROWA ANALIZA KOMPATYBILNOŚCI STARTERÓW	43
4.14. ANALIZA STATYSTYCZNA	43
4.14.1. Analiza wewnątrzpopulacyjna	43
4.14.2. Analiza międzypopulacyjna	44
4.14.3. Badanie pokrewieństwa	45
5. WYNIKI	47
5.1. NAZEWNICTWO SYSTEMÓW Y-STR	47
5.2. OPTIMALIZACJA MULTIPLEKSU	47
5.2.1. Ocena wpływu objętości mieszaniny reakcyjnej	48
5.2.2. Ocena wpływu temperatury pokrywy termocyklera	48
5.2.3. Ocena wpływu ilości DNA	49
5.2.4. Ocena wpływu ilości polimerazy DNA	49
5.2.5. Optymalizacja stężeń starterów	50
5.2.6. Optymalizacja nastrzyku elektrokinetycznego	51
5.2.7. Ocena wpływu rodzaju polimerazy DNA użytej do amplifikacji	52
5.2.8. Badanie czułości multipleksu	53

5.3. KONSTRUKCJA DRABINY ALLELI	54
5.3.1. Oszacowanie liczby alleli systemów Y-STR	54
5.3.2. Optymalizacja warunków sekwencjonowania	55
5.3.3. Sekwencjonowanie alleli Y-STR	56
5.3.4. Tworzenie drabin alleli dla poszczególnych systemów	57
5.3.5. Tworzenie drabiny alleli dla multipleksu	59
5.4. KONTROLA JAKOŚCI	60
5.5. CHARAKTERYSTYKA NIETYPOWYCH ALLELI Y-STR	61
5.5.1. Charakterystyka alleli pośrednich DYS385 i DYS392	61
5.5.2. Charakterystyka cichego allelu DYS19	62
5.6. ANALIZA POLIMORFIZMU MIKROSATELITARNYCH MARKERÓW CHROMOSOMU Y	64
5.6.1. Częstości alleli	64
5.6.2. Parametry określające przydatność poszczególnych loci Y-STR w genetyce sądowej	67
5.6.3. Analiza haplotypów	67
5.6.4. Wspólna baza danych haplotypów Y-STR	68
5.6.5. Porównanie haplotypów Y-STR w populacji polskiej, słowackiej i białoruskiej z danymi dla innych populacji	70
5.6.6. Analiza zmienności markerów Y-STR w badanych populacjach na poziomie haplogrup	73
5.7. PRZYKŁADY ZASTOSOWANIA MULTIPLEKSU W USTALANIU POKREWIEŃSTWA	77
5.7.1. Ustalenie pokrewieństwa domniemanych przyrodnych braci	77
5.7.2. Badanie genealogiczne	79
6. Dyskusja	82
7. Wnioski	103
8. Streszczenie	104
9. Piśmiennictwo	107
10. Załącznik	117

SKRÓTY

6-FAM	6-karboksyfluoresceina
AMOVA	analiza wariacji molekularnej
AmpFLP	polimorfizm długości powielonych fragmentów
BAC	sztuczny chromosom bakteryjny
bp	para zasad
CHES	kwas 2-(N-cykloheksyloamino)-etanosulfonowy
del	delecja
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
dNTP	trifosforany deoksynukleozydów
dR110	4,7-dichlororodamina 110
dR6G	4,7-dichlororodamina 6G
dROX	4,7-dichlororodamina X
dTAMRA	4,7-dichlorotetrametylorodamina
ESI	elektrozpylanie i jonizacja
F _{ST}	statystyka F
H	zróżnicowanie genetyczne
HEX	6-karboksy-2',4',5',7',7'-heksachlorofluoresceina
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
IPRP HPLC	HPLC na odwróconych fazach w układzie jonowo-asocjacyjnym
ISFG	Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Sądowej
kb	10 ³ par zasad
LINE	długie elementy rozproszone
LTR	długie powtórzenia terminalne
MALDI	laserowa desorpcja wspomagana matrycą i jonizacja
Mb	10 ⁶ par zasad
MRCA	najbliższy wspólny przodek
NCBI	amerykańskie Krajowe Centrum Informacji Biotechnologicznej
NRY	nierekombinująca część chromosomu Y
OPH	odsetek pojedynczych haplotypów
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy
RFLP	polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych
SINE	krótkie elementy rozproszone
SNP	polimorfizm pojedynczych nukleotydów
SSR	proste sekwencje powtórzone
STR	krótkie powtórzenia tandemowe
SWGDM	amerykańska Naukowa Grupa Robocza ds. Metod Analizy DNA
TAMRA	karboksytetrametylorodamina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TET	6-karboksy-2',4,7,7'-tetrachlorofluoresceina
Tris	tris(hydroksymetylo)aminometan
VNTR	zmienna liczba tandemowych powtórzeń
ZD	zdolność do dyskryminacji (ang. <i>discrimination capacity</i>)

Kraje pochodzenia porównywanych populacji (w oparciu o dwuliterowe kody państw w standardzie ISO 3166)

BA	Bośnia i Hercegowina
BG	Bułgaria
BY-C	Białoruś, część środkowa
BY-Pdl	populacja białoruska z Podlasia
BY-Pdzv	Białoruś, część północna (białorus. <i>Падзвінне</i>)
BY-Pls	Białoruś, część południowa (Polesie)
CS	Serbia i Czarnogóra
HR	Chorwacja
LT	Litwa
LV	Łotwa
MK	Macedonia
PL	Polska
RU-Mos	Rosja, rejon Moskwy
RU-Nov	Rosja, rejon Nowogrodu Wielkiego
RU-Pdl	populacja rosyjska z Podlasia (staroobrzędowcy)
SI	Słowenia
SK	Słowacja
UA	Ukraina

1. WSTĘP

1.1. POLIMORFIZM DNA

Polimorfizm genetyczny można zdefiniować jako występowanie w populacji dwóch lub więcej alleli w danym locus z częstością większą niż wynikająca z ogólnej częstości mutacji. Z uwagi na trudność oszacowania, jaka częstość allelu wynika z mutacji, często za polimorfizm w obrębie danego locus uznaje się występowanie najczęstszego allelu z częstością mniejszą niż 99% [50]. W przybliżeniu 0,3% ludzkiego genomu wykazuje polimorfizm i może być potencjalnie wykorzystane do badań w medycynie sądowej [28].

U człowieka sekwencje kodujące obejmują 30–40 tys. genów i stanowią ok. 5% genomu (ryc. 1.), podczas gdy sekwencje repetytywne zajmują co najmniej jego połowę [69]. Właśnie ów niekodujący rejon DNA, zajmujący ok. 95% genomu ludzkiego, charakteryzuje się wysokim polimorfizmem w porównaniu do konserwatywnego kodującego DNA. Wyróżnia się pięć klas sekwencji repetytywnych:

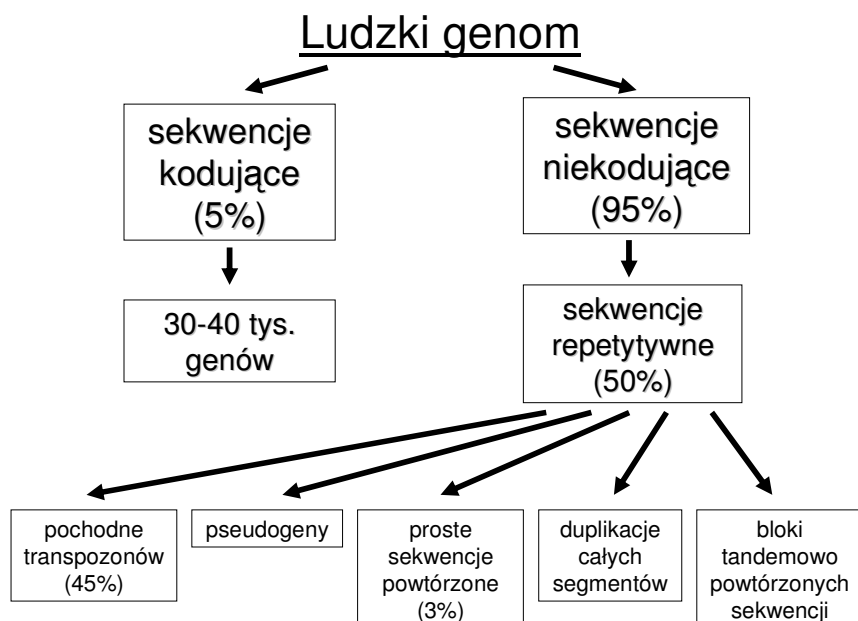
- sekwencje powtórzone będące pochodnymi transpozonów, często określane jako rozproszone sekwencje powtórzone;
- nieaktywne kopie genów komórkowych, zazwyczaj określane mianem pseudogenów;
- proste sekwencje powtórzone (SSR), składające się z prostych powtórzeń stosunkowo krótkich motywów;
- duplikacje całych segmentów, składające się z bloków wielkości ok. 10–300 kb, powielonych z innego rejonu genomu;
- bloki tandemowo powtórzonych sekwencji, takich jak w rejonie centromerów, telomerów, krótkich ramion chromosomów akrocentrycznych czy zgrupowań genów rybosomalnych.

Większość ludzkich sekwencji repetytywnych, znana jako rozproszone sekwencje powtórzone, pochodzi z elementów ulegających transpozycji, jako że aż 45% ludzkiego genomu przypisuje się taką genezę. Należą do nich długie elementy rozproszone (LINE), krótkie elementy rozproszone (SINE), retrotranspozony typu LTR oraz transpozony DNA. Insercje i delecje tych sekwencji stanowią jedno ze źródeł polimorfizmu ludzkiego DNA.

Przykładem elementów rozproszonych typu SINE w genomie człowieka jest klasa powtarzających się sekwencji, zwana rodziną Alu [166]. Nazwa tej rodziny pochodzi stąd, że w obrębie sekwencji Alu występuje miejsce rozpoznawane przez enzym restrykcyjny *Alu I*. Sekwencje Alu mają ok. 300 bp, są rozproszone w całym genomie i występują ok. 300 000

razy. Posiadają one zdolność do rozprzestrzeniania się w obrębie genomu dzięki procesowi retrotranspozycji, przyczyniając się tym samym do wzrostu zmienności genetycznej populacji.

Kolejną klasą sekwencji repetytywnych w ludzkiej populacji o niezwykle wysokim stopniu polimorfizmu są proste sekwencje powtórzone (SSR), które składają się z tandemowych powtórzeń określonej sekwencji [69]. Sekwencje SSR o krótkich jednostkach repetytywnych (1–13 bp) są często określane mianem mikrosatelitów, zaś w przypadku dłuższych jednostek repetytywnych (14–500 bp) stosuje się termin minisatelitów. SSR stanowią łącznie ok. 3% ludzkiego genomu, z największym udziałem powtórzeń dwunukleotydowych. W przybliżeniu jedna sekwencja typu SSR przypada na każde 2 000 bp.



Ryc. 1. Funkcjonalny podział ludzkiego genomu [69].

Zmienność genetyczna prostych sekwencji powtórzonych w populacji ludzkiej polega przede wszystkim na istnieniu zmiennej liczby tandemowych powtórzeń (VNTR). Szacuje się, że aż ponad 99% sekwencji mikrosatelitarnych wykazuje polimorfizm typu VNTR [169].

Sekwencje typu SSR odgrywają niebagatelną rolę w badaniach genetycznych człowieka z uwagi na wysoki stopień polimorfizmu, generowany stosunkowo częstymi przypadkowymi błędami dokonywanymi podczas replikacji przez polimerazę DNA. Markery genetyczne wykorzystujące polimorfizm sekwencji SSR znalazły zastosowanie w fizycznym i genetycznym mapowaniu genów, diagnostyce chorób genetycznych (zespół łamliwego

chromosomu X, płasawica Huntingtona), wykrywaniu nowotworów, w badaniach kryminalistycznych, identyfikacji osobniczej i w dochodzeniu spornego ojcostwa [46].

W piśmiennictwie z zakresu hemogenetyki sądowej systemy typu VNTR wykorzystywane w praktyce rzadko klasyfikuje się na sekwencje mini- i mikrosatelitarne. Częściej stosowany jest podział w oparciu o długość jednostki repetytywnej [169], w którym wyróżnia się dwie klasy:

- sekwencje typu STR, zawierające krótkie powtórzenia tandemowe (1–6 bp), najczęściej czteronukleotydowe;
- sekwencje typu AmpFLP, charakteryzujące się dłuższymi jednostkami repetytywnymi (najczęściej w przedziale 9–70 bp).

Jednak najliczniejszą grupę polimorficznych markerów genetycznych stanowią różnice w pojedynczych punktach genomu w postaci substytucji par zasad. Szacuje się, że tego typu polimorfizm występuje średnio raz na każde 100–300 par zasad ludzkiego genomu [142]. Zmienność genetyczna tych w olbrzymiej większości binarnych markerów określana jest jako polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP) i obejmuje zarówno klasyczny polimorfizm RFLP, jak i ten, który nie powoduje tworzenia nowych lub zniesienia istniejących miejsc restrykcyjnych. Wprawdzie analiza pojedynczych loci SNP z uwagi na binarny charakter dostarcza zdecydowanie mniej informacji genetycznej w porównaniu do analizy sekwencji typu SSR, jednak częstość ich występowania w ludzkim genomie oraz potencjalna łatwość automatyzacji ich analizy w dużej mierze rekompensują tę niedogodność i otwierają nowe możliwości dla wykorzystania tego typu polimorfizmu w badaniach genetycznych, diagnostyce molekularnej czy w medycynie sądowej.

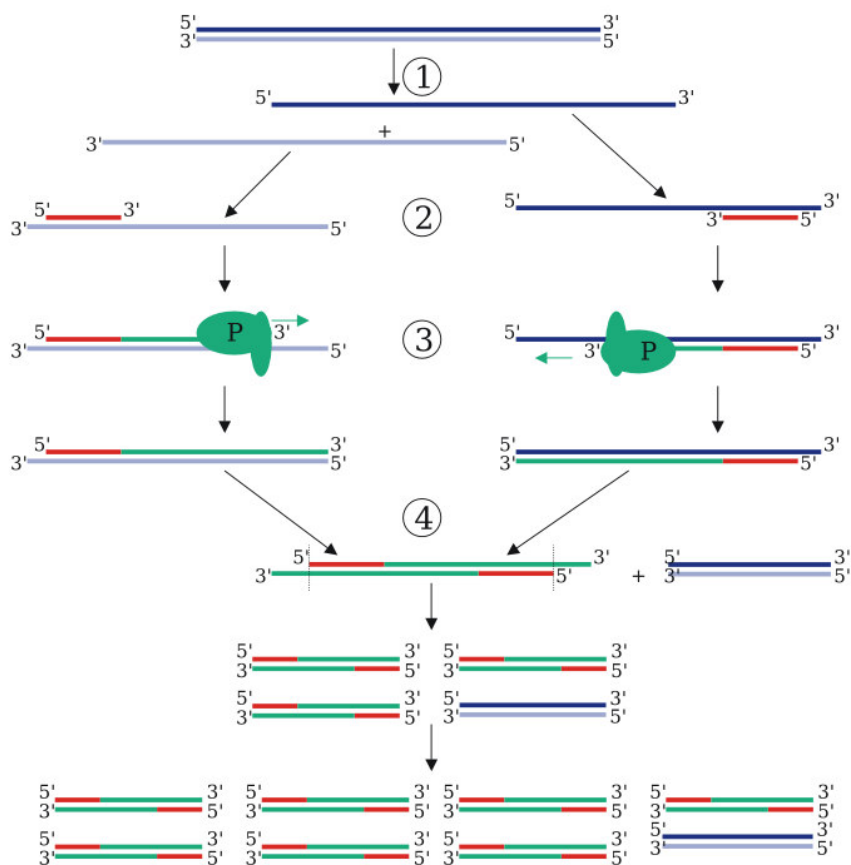
1.2. REAKCJA ŁAŃCUCHOWA POLIMERAZY

Metodą pozwalającą na specyficzne badanie sekwencji typu VNTR jest reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR), która polega na syntezie *in vitro* dużych ilości specyficznych fragmentów DNA o określonej długości i sekwencji z małych ilości matrycowego DNA [147]. Reakcja PCR oparta jest na enzymatycznej amplifikacji fragmentów DNA ograniczonych z obu stron oligonukleotydowymi starterami, które hybrydują z dwiema niciami powielanego fragmentu. Starter, którego sekwencja stanowi część nici kodującej lub sekwencji pierwotnie opisanej w literaturze, zwyczajowo określany jest jako starter *forward*, zaś drugi ze starterów nosi nazwę startera *reverse*.

Powtarzane cyklicznie etapy amplifikacji docelowej sekwencji dają w efekcie powielenie fragmentu ograniczonego przez końce 5' starterów. Ponieważ produkty wydłużania każdego ze starterów mogą służyć jako matryca dla następnych starterów, każdy cykl teoretycznie podwaja ilość fragmentów DNA wyprodukowanych w poprzednim cyklu, co prowadzi do wykładniczej akumulacji specyficznych produktów amplifikacji. Reakcja łańcuchowa polimerazy DNA z racji swej prostoty i możliwości analizy bardzo niewielkich ilości nawet silnie zdegradowanego materiału genetycznego znalazła szerokie zastosowanie w praktyce medyczno-sądowej.

W skład mieszaniny reakcyjnej wchodzi matrycowy DNA, startery, trifosforany deoksynukleozydów (dNTP), jony magnezu i polimeraza DNA. Wprowadzenie termostabilnej polimerazy DNA do metody PCR (np. polimerazy *Taq* z termofilnej bakterii *Thermus aquaticus*) znacznie poprawiło efektywność metody [146] i pozwoliło na automatyzację procesu w urządzeniach zwanych termocyklerami.

Każdy cykl amplifikacji rozpoczyna się od denaturacji cieplnej matrycowego DNA w temperaturze 92–96 °C [87]. Podniesienie temperatury mieszaniny reakcyjnej do tej wartości powoduje zerwanie wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi parami zasad i rozdzielenie nici DNA. W drugim etapie w temperaturze 37–72 °C następuje przyłączanie (hybrydyzacja) starterów do komplementarnych sekwencji matrycowego DNA. Trzeci etap, przebiegający w temperaturze 72 °C, polega na katalizowanym przez polimerazę DNA wydłużaniu (elongacji) przyłączonych starterów od końca 3' przez sukcesywne dołączanie dNTP (ryc. 2.). Standardowo stosuje się 25–35 (do 40) cykli amplifikacji, po których zwykle przeprowadza się przez 5–15 min inkubację w 72 °C w celu dokończenia niekompletnych syntez i pełnej hybrydyzacji jednoniciowych komplementarnych produktów.



Ryc. 2. Schemat reakcji PCR. Każdy cykl amplifikacji obejmuje denaturację dwuniciowego DNA (1), przyłączenie starterów (2) oraz ich wydłużanie przez polimerazę DNA (3), oznaczoną na schemacie literą P. Po zakończeniu pierwszego cyklu (4) z jednej cząsteczki DNA powstają dwie, które stanowią matrycę do amplifikacji w kolejnych cyklach, podwajając ilość DNA pod koniec każdego cyklu.

Jedną z odmian klasycznej reakcji PCR jest kompleksowa reakcja PCR (multiplex), której przebieg inicjowany jest poprzez dodanie do mieszaniny reakcyjnej więcej niż jednej pary starterów, co pozwala na jednoczesną amplifikację dwóch lub większej liczby fragmentów DNA [28]. Odkąd po raz pierwszy opisano tę metodę [40], bardzo szybko znalazła ona zastosowanie w genetyce sądowej [112] i stała się jej ważnym narzędziem, oferując kilka istotnych udogodnień w porównaniu do standardowej amplifikacji [33]. Koszt analizy oraz nakład pracy potrzebny do uzyskania wyników z badania wielu markerów został znacznie zredukowany, podczas gdy ilość informacji genetycznej uzyskiwanej na jednostkę czasu zdecydowanie wzrosła. Ponadto ilość matrycowego DNA niezbędnego do analizy wielu systemów jest o wiele mniejsza, zaś zmniejszenie manipulacji na badanym materiale genetycznym obniżyła ryzyko kontaminacji [152].

1.2.1. ARTEFAKTY POWSTAJĄCE W CZASIE REAKCJI PCR

Oprócz reakcji wydłużania startera na jednoniciowej matrycy DNA polimeraza *Taq* katalizuje niezależne od matrycy przyłączanie do końca 3' produktu amplifikacji pojedynczego nukleotydu (najczęściej adenozyne) [42]. Przy metodach detekcji o rozdzielczości jednej pary zasad w przypadku niekompletnego zajścia wspomnianej reakcji ten sam produkt może dawać podwójny sygnał. Niezależnemu od matrycy przyłączeniu adenozyne przez polimerazę *Taq* sprzyja wydłużenie do 30–45 min końcowego etapu inkubacji w 60–72 °C, wyższe stężenie jonów magnezu [6] oraz obecność dodatkowych nukleotydów na końcu 5' starterów [25, 92]. W celu ujednoczenia stopnia adenylacji badanych fragmentów DNA alternatywnie usuwa się przyłączone niezależnie od matrycy nukleotydy z końców 3' produktów amplifikacji poprzez ich inkubację po reakcji PCR z polimerazą DNA bakteriofaga T4 [52].

Amplifikacja metodą PCR loci mikrosatelitarnych może prowadzić do jednoczesnej syntezy artefaktów krótszych o wielokrotność jednostki repetytywnej, będących wynikiem ślizgania się polimerazy DNA w trakcie amplifikacji. Określa się je jako produkty typu *stutter* [6] lub (przy analizie metodą elektroforezy żelowej) jako cienie prążków (ang. „*shadow band*”) [102]. Stosunek ilości tego typu artefaktów do prawidłowych alleli jest tym wyższy, im krótsza jest jednostka repetytywna mikrosatelity [13] i im więcej jednakowych powtórzeń jednostki repetytywnej posiada dany allel [77, 85, 179].

W przypadku bardzo małych ilości DNA amplifikacja heterozygotycznych alleli loci autosomalnych lub markerów haploidalnych obejmujących kilka polimorficznych loci prowadzić może do przypadkowej dominacji jednego z alleli [116]. Przy niekorzystnym stosunku ilościowym powielanych fragmentów DNA niekiedy objawiać się to może brakiem amplifikacji jednego z alleli. Zjawisko to określane jest jako wypadanie alleli (ang. „*allelic drop-out*”). W przypadku markerów minisatelitarnych o dużym zakresie wielkości alleli, a tym samym potencjalnie dużych różnicach między powielanymi fragmentami DNA, źródłem wypadania alleli może być również preferencyjna amplifikacja krótszego allelu [154].

Brak amplifikacji jednego, rzadziej obu alleli markerów diploidalnych lub brak amplifikacji locus haploidalnego może być również spowodowany występowaniem w populacji cichych alleli, znanych też jako nieme lub zerowe (ang. „*silent allele / null allele*”). Ich źródłem są zmiany nukleotydów w sekwencjach rozpoznawanych przez startery

używane w reakcji PCR bądź delecje całego locus. W tym pierwszym przypadku stosowanie różnych starterów może prowadzić do niezgodności w genotypach tej samej osoby [4, 26, 27].

Innym zjawiskiem obserwowanym w badaniach metodą PCR jest amplifikacja dwóch i więcej alleli w locus haploidalnym, występującym pojedynczo na chromosomie, lub więcej niż dwóch alleli w locus diploidalnym [43]. Najczęściej spowodowane jest ono duplikacją danego locus [14, 34], choć może również wynikać z niespecyficzności starterów, rozpoznających poza właściwym locus również inne miejsca genowe [34, 47].

Innym rodzajem artefaktów są produkty niespecyficzne, które powstają w wyniku nieswoistego wiązania starterów podczas reakcji PCR lub oligomeryzacji starterów. Powstawaniu tego typu artefaktów zapobiegają odpowiednio zaprojektowane, specyficzne dla danego locus startery, które nie tworzą dimerów i struktur drugorzędowych, oraz zoptymalizowane warunki reakcji łańcuchowej polimerazy, obejmujące zarówno profil temperaturowy, jak i stężenia substratów i katalizatorów [33].

1.3. TECHNIKI ROZDZIAŁU, DETEKCJI I TYPOWANIA ALLELI STR

Aby móc wiarygodnie typować markery STR, muszą być spełnione co najmniej dwa wymagania [31].

Po pierwsze zastosowana technologia musi umożliwiać rozdział i detekcję wszystkich znanych alleli w przypadku danego systemu STR. Należy przy tym uwzględnić występowanie alleli pośrednich, które mogą się różnić od alleli o regularnej liczbie powtórzeń zaledwie o jeden nukleotyd (przykładem są allele 9.3 i 10 w systemie TH01).

Po drugie konieczne jest określenie rozmiaru produktu PCR i związanej z tym liczby powtórzeń danej sekwencji tak, aby do próbki mógł być przypisany określony genotyp. Ten ostatni wymóg jest najczęściej spełniany poprzez porównywanie próbki do drabiny alleli (ang. „*allelic ladder*”), stanowiącej mieszaninę alleli spotykanych w określonym locus, nazwanych zgodnie z zaleceniami Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej (ISFG) w oparciu o liczbę jednostek repetytywnych, zweryfikowaną poprzez sekwencjonowanie [16].

1.3.1. ELEKTROFOREZA ŻELOWA

Wraz ze wzrostem liczby nukleotydów tworzących cząsteczkę DNA, a tym samym jej masy, proporcjonalnie rośnie jej ładunek [28]. Na skutek tej zależności (stały stosunek masy

do ładunku) fragmenty DNA charakteryzują się zasadniczo identyczną ruchliwością elektroforetyczną. Dopiero odpowiednie złoża o formie sita molekularnego umożliwiają rozdział fragmentów DNA w zależności od ich wielkości. W tradycyjnej elektroforezie wymagania te spełniają żele agarozowe i poliakrylamidowe. Im większe fragmenty DNA przemieszczają się przez pory żelu pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego, tym ich migracja jest bardziej utrudniona.

Żele poliakrylamidowe są przygotowywane poprzez polimeryzację akrylamidu z dodatkiem odpowiedniego czynnika sieciującego. Właściwości fizyczne i rozmiary porów żelu są regulowane procentowym udziałem poliakrylamidu w żelu, jego stopniem usieciowania oraz stężeniem zawartych w nim jonów [63].

W natywnych (niedenaturujących) żelach poliakrylamidowych fragmenty DNA rozdzielane są w postaci dwuniciowej. Elektroforeza w tych warunkach przebiega szybciej w porównaniu do rozdziału w warunkach denaturujących, ponadto nie jest konieczna denaturacja prób, które mogą być naniesione na żel bezpośrednio po amplifikacji. Wadą tej metody są natomiast trudności w uzyskaniu rozdzielczości, która pozwalałaby oddzielić fragmenty różniące się długością zaledwie jednej pary zasad. Odpowiednio przygotowane natywne żele poliakrylamidowe eliminują jednak ten problem i pozwalają na osiągnięcie rozdzielczości jednej pary zasad dla fragmentów o długości do ok. 260 bp [132].

Żele denaturujące uzyskuje się poprzez stosowanie wysokich stężeń mocznika lub formamidu w połączeniu z podwyższoną temperaturą lub pH roztworu [28]. Mocznik i formamid tworzą wiązania wodorowe z zasadami azotowymi jednoniciowego DNA, zapobiegając jego oddziaływaniom z nicią komplementarną. Na skutek denaturacji obie nici każdego fragmentu DNA ulegają rozdzielaniu i mogą migrować przez pory żelu z nieznacznie różniącymi się prędkościami, co w przypadku barwienia srebrem może być widoczne jako podwójny prążek dla każdego z alleli [120]. Jako że cząsteczki jednoniciowego DNA o wiele efektywniej oddziałują ze złożem [28], denaturujące żele poliakrylamidowe umożliwiają rozdział fragmentów różniących się zaledwie jednym nukleotydem [120].

Po rozdziale elektroforetycznym fragmenty DNA mogą być barwione azotanem srebra [2, 18]. Metoda ta jest mniej kosztowna w porównaniu z metodą detekcji opartą na fluorescencji, gdyż nie wymaga kosztownych odczynników i aparatury. Jednakże w przypadku elektroforezy w warunkach denaturujących mogą być wykrywane obie nici DNA, co może niekiedy utrudniać interpretację wyników.

Inne techniki detekcji fragmentów DNA rozdzielonych elektroforetycznie opierają się o ich znakowanie fluorescencyjne. Najczęściej stosowaną metodą znakowania jest dołączanie

barwnika fluorescencyjnego do końca 5' jednego ze starterów użytych do amplifikacji [49]. W tym przypadku na żelach denaturujących również dochodzi do rozdziału obu nici danego fragmentu DNA, jednak tylko wykrywana jest nić znakowana fluorescencyjnie. Tego typu metoda znakowania jest najczęściej wykorzystywana w zautomatyzowanych systemach detekcji, takich jak ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

Kolejną modyfikacją jest znakowanie produktów PCR po amplifikacji poprzez zastosowanie w trakcie rozdziału barwników fluorescencyjnych interkalujących do DNA. Również analogicznie do barwienia srebrem możliwe jest barwienie żeli po elektroforezie odpowiednim barwnikiem fluorescencyjnym, np. bromkiem etydydy lub barwnikiem SYBR Green (Molecular Probes).

Stosując odpowiednią agarozę wysokiej rozdzielczości oraz detekcję poprzez barwienie SYBR Green, do rozdziału alleli STR mogą być wykorzystywane również żele agarozowe. W tym przypadku rozdzielczość jest zadowalająca nawet w odniesieniu do fragmentów różniących się zaledwie powtórzeniami dwunukleotydowymi [180].

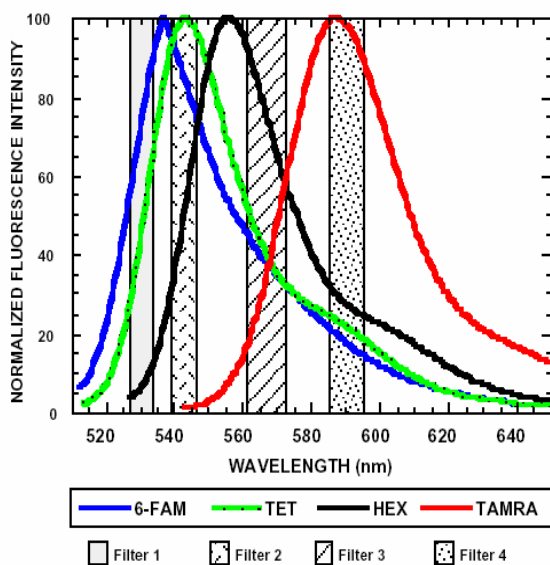
1.3.2. ELEKTROFOREZA KAPILARNA

Rozdział alleli STR może być przeprowadzony w krótkim czasie przy użyciu elektroforezy kapilarnej [28]. Wąska kapilara stosowana w przypadku tej metody (np. o wewnętrznej średnicy 50 μm) pozwala na efektywne rozpraszanie ciepła wydzielanego na skutek korzystania z wysokich napięć, umożliwiając znacznie szybszy rozdział DNA. Kolejną ważną zaletą elektroforezy kapilarnej jest pełna automatyzacja procesu bez potrzeby wylewania żelu czy ręcznego nanoszenia prób. Odkąd po raz pierwszy zademonstrowano przydatność tej metody do rozdziału alleli loci wykazujących polimorfizm VNTR [97], technika ta poważnie się rozwinęła i obecnie opiera się na znacznie czulszej detekcji fluorescencyjnie znakowanych fragmentów DNA. Do bezbłędnego typowania alleli STR powszechnie wykorzystuje się wewnętrzne standardy wielkości po uprzedniej kalibracji czasów migracji różnych alleli danego locus w stosunku do standardu wielkości [32].

Przykładem urządzenia opartego na elektroforezie kapilarnej, które obecnie używane jest rutynowo w badaniach genetyczno-sądowych, jest ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) [28]. Zaletą tego systemu jest automatyzacja analizy oraz możliwość jednoczesnej detekcji fragmentów znakowanych czterema lub pięcioma różnymi barwnikami fluorescencyjnymi. Ponadto w procesie nastrzyku zużywane są jedynie minimalne ilości badanej próbki, której analiza w razie potrzeby może być łatwo powtórzona. Urządzenie to do

elektroforezy wykorzystuje środowisko denaturujące, oparte o wymienialny roztwór polimeru, i pozwala na rozdzielczość jednej zasady dla fragmentów o długości do ok. 350 nukleotydów [30].

Źródłem wzbudzenia fluorescencji barwników stosowanych do znakowania fragmentów DNA są lasery. W aparacie ABI Prism 310 Genetic Analyzer używa się jonowego lasera argonowego, dostarczającego światła o długości fali 488 nm i 514,5 nm [28]. Podczas elektroforezy urządzenie zapisuje intensywność fluorescencji jako funkcję czasu i długości fali w czterech lub pięciu nienachodzących na siebie zakresach widma. Jako że barwniki fluorescencyjne po wzbudzeniu światłem lasera emitują widmo ciągłe, ich rozróżnianie opiera się na długości fali dla maksimum emisji (ryc. 3.), zaś wieloskładnikowa macierz wykorzystywana w analizie intensywności fluorescencji umożliwia korektę nachodzenia widm pomiędzy poszczególnymi barwnikami. Macierz ta odejmuje w zakresie detekcji każdego barwnika część sygnału spowodowaną przez fluorescencję innych barwników. Po korekcie sygnał fluorescencji kodowany jest w postaci kolorów i wyświetlany jako piki na elektroforogramie, na którym barwnikom o rosnącej długości fali dla maksimum emisji kolejno przypisane są barwne panele: niebieski, zielony, żółty/czarny, czerwony i pomarańczowy [6].



Ryc. 3. Znormalizowane widma emisji barwników fluorescencyjnych stosowanych w wirtualnym zestawie filtrów C [6].

1.3.3. ARTEFAKTY TOWARZYSZĄCE METODOM DETEKЦИИ OPARTYM NA ZNAKOWANIU FLUORESCENCYJNYM RÓŻNYMI BARWNIKAMI

Analizie wielobarwnikowej mogą towarzyszyć artefakty w postaci przecieków (ang. „*bleedthrough / pull-up*”), objawiających się jako niskie piki jednego koloru, leżące bezpośrednio pod znacznie wyższymi pikami innego koloru w sytuacji, gdy nie ma produktu PCR odpowiadającego niższemu pikowi [164]. Powstają one na skutek niedostatecznego odejmowania sygnału fluorescencji przez zastosowaną macierz i towarzyszą pikom o zbyt intensywnym sygnale fluorescencji, przekraczającym górną granicę detekcji urządzenia. Wraz z podwyższoną linią podstawową między pikami, spowodowaną nadmiernym odejmowaniem sygnału fluorescencji, sygnalizują one również pogarszającą się jakość macierzy [6].

Na skutek obecności wolnych barwników fluorescencyjnych, niezwiązanych ze starterami, w obrazie elektroforetycznym pojawiać się mogą szerokie piki zwane kleksami (ang. „*dye blob*”) [36]. Innym rodzajem artefaktów obserwowanych na elektroforogramach są ostre piki o jednakowej intensywności we wszystkich panelach (ang. „*spikes*”), spowodowane obecnością w polimerze pęcherzyków powietrza, kryształków mocznika lub fluktuacjami napięcia [28] oraz piki odpowiadające niezdenaturowanemu DNA [164].

1.3.4. INNE METODY TYPOWANIA ALLELI STR

Niewiarygodnie krótki czas typowania alleli loci STR oferuje spektrometria masowa [177]. Analizowany fragment DNA może być oznaczany z doskonałą precyzją zaledwie w przeciągu kilku sekund. W pierwszym etapie oczyszczone produkty PCR poddawane są jonizacji, której w przypadku loci STR dokonuje się poprzez elektrorozpylanie (ESI) [64] lub laserową desorpcję wspomaganą matrycą (MALDI) [31]. Zjonizowane cząsteczki przechodzą do dalszych przedziałów spektrometru masowego, gdzie formowana jest wiązka jonów. Wiązka ta jest kierowana do analizatora masy, którym może być np. analizator czasu przelotu (TOF), na podstawie którego w porównaniu do standardów masy obliczany jest rozmiar fragmentu DNA.

Z uwagi na precyzję pomiaru przy zastosowaniu spektrometrii masowej allele STR mogą być typowane bez konieczności porównywania z drabinami znanych alleli. Jednak jak każda metoda spektrometria masowa posiada pewne ograniczenia. Analizowane fragmenty nie mogą przekraczać ok. 150 bp, co w przypadku niektórych systemów STR wiąże się z koniecznością projektowania nowych starterów do amplifikacji [143]. Dodatkowo

czynnikiem odgrywającym istotną rolę w rozdzielczości, dokładności i precyzji oznaczania masy jest jakość próby, która przed analizą wymaga dodatkowego oczyszczenia i usunięcia śladów soli [159].

Do bezpośredniej detekcji i dokładnego genotypowania alleli STR wykorzystuje się również wysokosprawną chromatografię cieczową na odwróconych fazach w układzie jonowo-asocjacyjnym (IPRP HPLC) [46]. W chromatografii na odwróconych fazach wykorzystuje się hydrofobowe złożo jako fazę stacjonarną, podczas gdy fazę ruchomą stanowi polarny rozpuszczalnik. Natomiast układ jonowo-asocjacyjny opiera się na zjawisku neutralizacji ładunku rozdzielanych składników poprzez dodanie do fazy ruchomej związków jonowych zawierających grupę nadającą charakter hydrofobowy (najczęściej łańcuch węglowodorowy), dzięki czemu tworzące się pary jonów mogą podlegać rozdziałowi na kolumnach o odwróconych fazach. Przy zastosowaniu octanu trietyloamoni jako czynnika neutralizującego polarny charakter DNA w fazie ruchomej możliwe jest wiązanie produktów PCR do alkilowanego złoża stanowiącego fazę stacjonarną i ich późniejsza elucja wzrastającym stężeniem acetonitrylu. Detekcja rozdzielonych fragmentów poprzez analizę absorpcji przy 260 nm pozwala na bezbłędne typowanie alleli STR w formie dwuniciowej, różniących się czteronukleotydowymi powtórzeniami o rozmiarach do ok. 350 bp. Do niewątpliwych zalet tej metody należy zaliczyć stosunkowo krótki czas analizy (ok. 15 min na próbkę) oraz fakt, iż IPRP HPLC nie wymaga jakiegokolwiek przygotowania próbki przed analizą. Problemem natomiast jest rozdzielczość metody, która pozwala na rozdział fragmentów DNA różniących się jednym nukleotydem tylko w przypadku produktów PCR nieprzekraczających ok. 125 bp.

Ogromne uproszczenie typowania loci STR umożliwiają mikromacierze opierające się na hybrydyzacji komplementarnych nici jednoniciowego DNA [125]. W typowaniu mikrosatelitów konieczne jest rozróżnienie kompleksów danego allelu z sondami molekularnymi, w którym obie sondy ściśle przylegają do siebie, od kompleksów, w których sondy są od siebie oddzielone lub nachodzą na siebie. Tego typu dyskryminacja wykorzystuje siłę oddziaływań stakingowych między zasadami azotowymi przylegających do siebie sond i wymaga warunków o bardzo wysokiej swoistości hybrydyzacji (niskie stężenie soli, wysoka temperatura). Z podłożem mikromacierzy trwale związane są sondy molekularne, po czym przeprowadzana jest hybrydyzacja oznaczanych alleli z sondami w polu elektrycznym, które podnosi stężenie badanych fragmentów DNA w otoczeniu sond molekularnych, redukując czas niezbędny do hybrydyzacji w warunkach o wysokiej swoistości hybrydyzacji [48].

W kolejnym etapie przeprowadza się hybrydyzację z sondą znakowaną fluorescencyjnie, odczytuje sygnał hybrydyzacji i analizuje dane za pomocą systemów informatycznych.

1.4. LUDZKI CHROMOSOM Y

Chromosom Y stanowi tylko 2% genomu człowieka i obejmuje w przybliżeniu 57 Mb [123], jest zatem jednym z najmniejszych ludzkich chromosomów (krótsze są tylko chromosomy 21 i 22). Wyróżnia się w nim dwa regiony pseudoautosomalne (PAR1 i PAR2), zlokalizowane w dystalnej części krótkiego i długiego ramienia chromosomu. Regiony te są homologiczne do sekwencji chromosomu X i odpowiadają za prawidłowe łączenie się oraz rekombinację obu chromosomów płci podczas mejozy.

Jednak większość ludzkiego chromosomu Y (95%) nie podlega rekombinacji. Fragment ten, określany jako NRY (ang. „*non-recombining Y*”), stanowi haploidalny DNA specyficzny dla osobników płci męskiej i dziedziczony jest wyłącznie z ojca na syna. Podobnie jak mitochondrialny DNA dziedziczony wyłącznie po matce, chromosom Y jest dogodnym narzędziem wykorzystywanym w badaniach populacyjnych związanych z ewolucją gatunku oraz migracją osobników [72, 73, 150].

Początkowo chromosom Y wydawał się najmniej polimorficznym ludzkim chromosomem [136], jednak liczba markerów sprzężonych z tym chromosomem, wykorzystywanych w badaniach populacyjnych, filogenetycznych, genealogicznych i w medycynie sądowej nieustannie rośnie [77]. Dotychczas na ludzkim chromosomie Y zidentyfikowano liczne markery genetyczne wynikające z substytucji par zasad, mutacji typu insercja / delecja, jak również sekwencje mikro- i minisatelitarne [123].

Wśród markerów genetycznych o binarnym polimorfizmie, które charakteryzują się bardzo niską częstością mutacji, wykazano obecność insercji YAP z rodziny Alu (DYS287) [38], będącej przykładem sekwencji rozproszonej typu SINE, oraz licznych markerów typu SNP [70]. I tak częstość mutacji dla SNP szacowana jest na poziomie $2,5 \cdot 10^{-8}$ / nukleotyd / pokolenie [103]. W związku z tym markery binarne postrzegane są jako unikalne wydarzenia w ewolucji człowieka i ich analiza stanowi doskonałe narzędzie do konstruowania drzew filogenetycznych [71]. Wykorzystywanie są również do badań prehistorycznych migracji populacji ludzkich i kolonizacji kontynentów [115, 140]. Haplotypy zdefiniowane przez markery typu Y-SNP wykazują wysoki stopień specyficzności populacyjnej i nie są przypadkowo rozmieszczone wśród ludzkich populacji, co w genetyce sądowej może znaleźć potencjalne zastosowanie np. w przewidywaniu pochodzenia sprawcy przestępstwa [70].

Spośród znacznie bardziej podatnych na mutacje markerów o polimorfizmie typu VNTR, na chromosomie Y zidentyfikowano dotychczas 2 systemy typu AmpFLP: MSY1 (DYF155S1) i MSY2 (DYS440) [15], oraz ok. 220 różnych systemów typu STR [57, 77]. W przypadku systemów Y-STR stwierdzono, że średnia częstość mutacji waha się w przedziale 0,002–0,003 / locus / pokolenie [62, 79].

Znajomość częstości mutacji loci STR z uwagi na ich powszechność wykorzystania w genetyce sądowej jest istotna dla właściwej interpretacji wyników w badaniach mających na celu ustalenie pokrewieństwa, w których wykazane niezgodności między porównywanymi haplotypami są uwzględniane w określaniu prawdopodobieństwa pokrewieństwa badanych osób [80, 138].

W genetyce sądowej olbrzymie znaczenie znalazło również inne, niepolimorficzne locus zlokalizowane w obrębie niepodlegającej rekombinacji części chromosomu Y. Stanowi ono sekwencję homologiczną do obecnego na chromosomie X genu amelogeniny. Wykazano, że amplifikacja fragmentu genu amelogeniny przy użyciu jednej pary starterów powoduje powstanie produktów o różnych rozmiarach w zależności od tego, czy amplifikacji ulega sekwencja specyficzna dla chromosomu X czy dla chromosomu Y [1]. W związku z tym identyfikacja jednego produktu wskazuje, że badany DNA pochodzi od kobiety, zaś identyfikacja dwóch różnych produktów wskazuje na obecność DNA mężczyzny, co dzięki prostocie i czułości analizy zostało z powodzeniem wykorzystane do ustalania płci w badaniach śladów biologicznych i identyfikacji osobniczej [112].

Fakt, iż chromosom Y jest charakterystyczny tylko dla osobników płci męskiej, pozwala poprzez zastosowanie analizy systemów Y-STR na wykrywanie i różnicowanie materiału genetycznego pochodzącego od mężczyzn. Szczególnie przydatne jest to w przypadkach, kiedy konieczne jest ustalenie pokrewieństwa osób płci męskiej, jak również przy analizie śladów biologicznych pochodzących z przestępstw na tle seksualnym [71]. Znaczne korzyści daje zastosowanie analizy sekwencji mikrosatelitarnych chromosomu Y do identyfikacji DNA mężczyzny w śladach stanowiących mieszaninę DNA mężczyzny i kobiety oraz w przypadkach gwałtów zbiorowych, kiedy ma się do czynienia z materiałem genetycznym pochodzącym od kilku osobników. Innym bardzo praktycznym zastosowaniem analizy sekwencji typu Y-STR są przypadki w dochodzeniu spornego ojcostwa, kiedy domniemany ojciec jest nieosiągalny. Wówczas niezwykle pomocna staje się analiza sekwencji chromosomu Y krewnych z linii męskiej, pozwalająca odtworzyć informację o haplocyocie chromosomu Y pozwanego mężczyzny.

Jednak brak rekombinacji regionu NRY może być również czynnikiem utrudniającym interpretację wyników [71, 123]. O ile wykluczenie podejrzanego o popełnienie przestępstwa lub domniemanego ojca wyłącznie na podstawie analizy polimorficznych loci chromosomu Y nie pozostawia większych wątpliwości, o tyle udowodnienie winy lub ojcostwa na tej podstawie może być w niektórych przypadkach problematyczne. Przyczyną tego jest fakt, iż wszyscy krewni podejrzanego bądź domniemanego ojca z założenia posiadają ten sam haplotyp chromosomu Y. Taka sytuacja przy genotypowaniu loci autosomalnych występuje tylko w rzadkim przypadku bliźniąt jednojajowych, choć z drugiej strony wykazanie zgodności porównywanych haplotypów chromosomu Y staje się niekiedy niezwykle cenne w poszukiwaniu sprawcy przestępstwa wśród krewnych podejrzanego [45]. Ponadto na skutek określonych wydarzeń demograficznych w pewnych populacjach niektóre haplotypy chromosomu Y mogą występować z bardzo dużą częstością, przez co uzyskana przy pomocy ich analizy informacja może się okazać niewystarczająca [71, 77].

1.4.1. SYSTEMY KOMPLEKSOWEJ REAKCJI PCR W ANALIZIE POLIMORFIZMU LOCI Y-STR

Wraz z odkrywaniem kolejnych loci STR chromosomu Y podjęto wysiłki w celu stworzenia układów kompleksowej reakcji PCR.

Pierwsze doniesienia dotyczą multipleksów opartych na detekcji znakowanych fluorescencyjnie produktów PCR, obejmujących zaledwie kilka markerów [59, 98, 119]. Równoległe prowadzono badania nad układami kompleksowej reakcji PCR barwionymi srebrem po rozdiale elektroforetycznym w denaturujących [161] lub natywnych żelach poliakrylamidowych [129]. Z uwagi na możliwość detekcji produktów PCR w nachodzących na siebie zakresach wielkości dzięki wyznakowaniu starterów różnymi barwnikami fluorescencyjnymi, kolejne doniesienia dotyczyły multipleksów pozwalających na jednoczesną amplifikację kilkunastu i więcej loci, które określa się jako megapleksy. Aktualnie znane są 3 takie układy, obejmujące 11, 20 i 25 loci mikrosatelitarnych chromosomu Y [35, 66, 156].

Podobnie rozwijały się komercyjne zestawy do analizy loci STR chromosomu Y. Jako pierwsze pojawiły się 4 zestawy GeneKin (GeneKotech) rozdzielane w denaturujących żelach poliakrylamidowych i barwione srebrem, umożliwiające jednoczesne genotypowanie 3–4 loci Y-STR. Dotychczas w ofercie handlowej pojawiło się 8 multipleksów do analizy polimorfizmu mikrosatelitarnego chromosomu Y w oparciu o detekcję fluorescencji (firmy:

Applied Biosystems, Biotype, Promega, ReliaGene Technologies, Serac), z których tylko 3 zestawy zasługują na miano „megapleksów”: Y-PLEX 12 (Reliagene Technologies; 11 loci STR oraz locus amelogeniny), PowerPlex Y (Promega; 12 loci STR) oraz Yfiler (Applied Biosystems; 17 loci STR). W 2005 r. z uwagi na prawo patentowe zestawy firmy ReliaGene Technologies zostały wycofane ze sprzedaży i liczba dostępnych komercyjnie megapleksów zmniejszyła się do dwóch.

1.4.2. ZNACZENIE BADAŃ POPULACYJNYCH POLIMORFIZMU CHROMOSOMU Y W GENETYCE SĄDOWEJ

Przed wprowadzeniem jakiegokolwiek systemu genetycznego do badań w praktyce medyczno-sądowej istnieje konieczność przeprowadzenia badań populacyjnych [126], które umożliwiają oszacowanie częstości poszczególnych alleli bądź haplotypów w danej populacji. Na podstawie uzyskanych wyników możliwe jest określenie prawdopodobieństwa przypadkowego wystąpienia określonego genotypu w populacji. Dane te są niezwykle istotne w statystycznej ocenie pokrewieństwa porównywanych osób lub popełnienia przestępstwa przez podejrzanego w sprawie karnej.

Zestaw 9 loci mikrosatelitarnych chromosomu Y, obejmujący systemy DYS19, DYS385, DYS389, DYS390, DYS391, DYS392 i DYS393, określany jest w genetyce sądowej jako tzw. haplotyp minimalny, zaś ten sam zestaw poszerzony o kolejne 2 loci nazwano haplotypem rozszerzonym [135]. Wyniki genotypowania loci Y-STR haplotypu minimalnego i rozszerzonego w próbkach pochodzących z różnych populacji na świecie gromadzone są w publicznie dostępnej bazie danych YHRD [75, 91, 137], która z racji na liczbę zdeponowanych w niej haplotypów stanowi niezwykle cenne narzędzie do szacowania ich częstości pod kątem obliczeń biostatystycznych w praktyce medyczno-sądowej.

Jako że stosunkowo dobrze poznane haplotypy minimalne chromosomu Y posiadają ograniczoną siłę dyskryminacji [117, 137], istnieje konieczność rozszerzenia zakresu badanych loci tego chromosomu o kolejne markery, których przydatność w genetyce sądowej wymaga empirycznej weryfikacji pod kątem ewentualnego ich włączenia do zestawu rutynowo badanych loci [19].

Niekiedy pula genowa populacji współtworzona jest przez osobniki o zróżnicowanym pochodzeniu etnicznym, z którą to sytuacją często ma się do czynienia w regionach przygranicznych i w dużych metropoliach. Obliczenie średniej ważonej dla częstości haplotypu występującego z różną frekwencją w dwóch populacjach ma raczej niewielkie

zastosowanie w praktyce, chociażby z uwagi na niejednokrotnie występujące znaczne różnicowanie udziału poszczególnych grup etnicznych na stosunkowo niewielkim obszarze. Przy ocenie prawdopodobieństwa pokrewieństwa stosuje się prostsze rozwiązanie, wykonując niezależne obliczenia dla obu populacji i wybierając wartość bardziej konserwatywną [Charles H. Brenner, informacja ustna]. Jeśli jednak liczba zebranych haplotypów Y-STR w jednej z baz danych jest niewielka, prowadzić to może do zaniżenia wartości posiadanej informacji genetycznej i uzyskania niewielkiego ilorazu wiarygodności, niewystarczająco wysokiego do wydania rozstrzygającej opinii. Ponadto w przyszłości w jednoczącej się Europie migracje, a tym samym przepływ genów między populacjami, z pewnością będą znacznie bardziej intensywne, co wiązać się może z koniecznością okresowego uaktualniania bazy danych częstości alleli w populacji. Ewentualne połączenie baz danych, poprzedzone oceną homogeniczności populacji, stanowi więc bardzo korzystne rozwiązanie. Poza możliwością znacznego powiększenia bazy danych wykazanie homogeniczności teoretycznie pozwala również na stosowanie w praktyce bazy częstości dla jednej z genetycznie jednorodnych populacji w przypadku nieznaności częstości alleli / haplotypów w innych populacjach.

1.4.3. BADANIA POPULACYJNE POLIMORFIZMU CHROMOSOMU Y W ANTROPOLOGII

Od dawna znany jest fakt nierównomiernego rozprzestrzenienia na świecie polimorficznych cech genetycznych człowieka, co znalazło szerokie zastosowanie w badaniach antropologicznych [39, 126]. Jednakże ze względu na ogromną liczbę polimorficznych loci w obrębie nerekombinującego haplotypu, szczególną wrażliwość na zmiany częstości haplotypów spowodowane czynnikami losowymi (tzw. dryf genetyczny) oraz potwierdzony badaniami genetycznymi znacznie niższy wskaźnik migracji mężczyzn w porównaniu do kobiet [157], istotne różnice w rozkładzie haplotypów chromosomu Y mogą występować nawet między blisko spokrewnionymi populacjami [136].

Owe unikalne cechy uczyniły ludzki chromosom Y nieocenionym narzędziem w badaniach nad ewolucją gatunku [73]. W zależności od skali czasu, w której doszło do określonych wydarzeń w historii analizowanych populacji, w badaniach używa się różnych polimorficznych układów sprzężonych z chromosomem Y. Jako że markery binarne charakteryzują się niezwykle niską częstością mutacji, polimorfizm wynikający z pojawienia się nowego allelu w populacji jest najczęściej skutkiem pojedynczej mutacji w ewolucji

gatunku ludzkiego [71]. Analiza wolno ewoluujących markerów Y-SNP pozwoliła na wgląd w prehistoryczne wędrówki ludów i fale kolonizacji w Europie [115, 140]. Z drugiej strony markery Y-STR charakteryzujące się znacznie wyższą częstością mutacji okazują się o wiele bardziej przydatne w badaniach genetycznych stosunkowo niedawnych wydarzeń [78, 134].

Brak rekombinacji w czasie mejozy powoduje, że jedynym źródłem zmienności w obrębie NRY są mutacje [73]. Badając zatem określony zestaw markerów binarnych, uzyskuje się grupy identycznych haplotypów o wspólnym pochodzeniu, określane mianem haplogrup [71]. Analiza 22 markerów binarnych wykazała, że ponad 95% chromosomów Y w Europie można przyporządkować do zaledwie 10 różnych rodowodów o zróżnicowanym rozkładzie częstości w różnych populacjach [158]. Charakterystyczna dla Europy Zachodniej jest haplogrupa R1b, podczas gdy w populacjach słowiańskich Europy Środkowej i Wschodniej dominuje haplogrupa R1a [115].

1.5. POPULACJE SŁOWIAŃSKIE

Słowianie stanowią obecnie najliczniejszą ludnościowo grupę w Europie [54]. Wielkie wędrówki ludów w IV–VII wieku rozprzestrzeniły Słowian w większej części Europy Wschodniej [106], dając początek etniczno-kulturowemu rozdrobnieniu pierwotnie jednolitej społeczności prasłowiańskiej. Narody słowiańskie na skutek splotu czynników historycznych i politycznych znalazły się w dwóch różnych strefach kulturowych: grecko-bizantyjskiej i łacińsko-rzymskiej. W ten sposób ukształtowały się dwie Słowiańszczyzny: *Slavia Orthodoxa*, obejmująca Rosję, Ukrainę, Białoruś, Serbię, Macedonię i Bułgarię, oraz *Slavia Latina (Romana)* z Polską, Czechami, Słowacją, Łużycami, Słowenią i Chorwacją. Wykładnikami tej przynależności jest religia: prawosławie lub katolicyzm (a od czasów reformacji także protestantyzm), oraz alfabet: łaciński w strefie zachodniej i cyrylica we wschodniej [44]. Z językowego punktu widzenia dzieli się Słowian na trzy grupy: Słowian zachodnich (Polaków, Słowaków, Czechów i Łużyczan), wschodnich (Białorusinów, Ukraińców i Rosjan) oraz południowych (Słoweńców, Chorwatów, Bośniaków, Serbów, Macedończyków i Bułgarów) [54].

Już pierwsze wyniki uzyskane dla analizy wariacji molekularnej haplotypów Y-STR wielu populacji europejskich wykazały, że 3 zbadane populacje słowiańskie (rejon Warszawy, Wrocławia i Moskwy) tworzą niejako oddzielną gałąź w drzewie filogenetycznym populacji europejskich [137], przy czym dalsze badania wykazały znaczne różnice między populacją rejonu Moskwy a subpopulacjami różnych regionów Polski [117]. Jako że kształtowanie się

narodów słowiańskich miało miejsce stosunkowo niedawno, zaś istotne różnice w rozkładzie haplotypów Y-STR występują nawet między blisko spokrewnionymi populacjami [136], mikrosatelity chromosomu Y wydają się szczególnie cennymi markerami w badaniach wzajemnych relacji między tymi populacjami.

Dotychczasowe badania wykazały statystycznie istotne różnice w rozkładzie haplotypów minimalnych Y-STR między populacją polską a sąsiednimi populacjami: niemiecką i litewską [78, 117]. Jednakże języki, którymi posługują się Polacy, Niemcy i Litwini, należą do różnych grup w obrębie indoeuropejskiej rodziny językowej. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono natomiast danych na temat relacji genetycznych Y-STR między populacją polską a sąsiednimi populacjami mówiącymi językami słowiańskim, np. Słowakami czy Białorusinami.

Języki polski i słowacki należą do grupy języków zachodniosłowiańskich i dlatego z językowego punktu widzenia Polacy i Słowacy wydają się blisko spokrewnieni. Jednakże ziemie polskie i słowackie dzielą od siebie Karpaty, które przez większą część historii obu narodów stanowiły niezwykle stabilną granicę polityczną. Z drugiej strony znaczna część zachodniosłowiańskich Polaków i wschodniosłowiańskich Białorusinów przez ponad pół tysiąclecia była obywatelami jednego państwa: Rzeczypospolitej Obojga Narodów, Cesarstwa Rosyjskiego (środkowa i wschodnia Polska) i międzywojennej II Rzeczypospolitej (zachodnia Białoruś) [106].

Badania nad polimorficznymi sekwencjami chromosomu Y podjęte w niniejszej pracy wydają się być przydatnym narzędziem badawczym wzajemnych relacji między tymi populacjami.

1.6. CHARAKTERYSTYKA BADANYCH LOCI Y-STR

Zgodnie z zaleceniami ISFG allele systemów Y-STR nazywane są w oparciu o liczbę jednostek repetytywnych występujących w allelu [51, 57]. Stosowana nomenklatura dotyczy zarówno loci, których region repetytywny składa się z jednakowych jednostek, jak i tych o zróżnicowanych motywach.

W przypadku alleli pośrednich (mikrowariantów) przyjmuje się zapis, w którym podaje się kompletną liczbę jednostek repetytywnych oraz po kropce liczbę nukleotydów wchodzących w skład niekompletnego powtórzenia.

DYS19

Pierwszą opisaną sekwencją STR obecną na chromosomie Y jest locus Y-27H39, znane obecnie jako **DYS19** [133]. Marker zidentyfikowany jako **DYS394** jest tożsamy z **DYS19** [51]. Locus to mieści się na krótkim ramieniu chromosomu Y [23] i obejmuje czteronukleotydomowe powtórzenia o motywie $(TAGA)_3TAGG(TAGA)_n$, przy czym jednostka **TAGG** nie jest liczona przy nazywaniu alleli [57]. Marker **DYS19** jest jednym z 9 loci haplotypu minimalnego. Dotychczas zaobserwowano 12 różnych alleli tego locus w zakresie 10–19, w tym 2 mikrowarianty **DYS19*13.2** i **DYS19*16.2** [YHRD, edycja 17].

DYS385

System **DYS385** obejmuje 2 loci będące skutkiem duplikacji i inwersji odcinka długości ok. 190 kb [83]. Mieszczą się one na długim ramieniu chromosomu Y i oddzielone są od siebie o ok. 40 kb. Charakteryzują się identycznym motywem $(AAGG)_{6-7}(GAAA)_n$, przy czym w większości alleli sekwencja **AAGG** powtórzona jest 6 razy. Mimo stwierdzenia polimorfizmu VNTR jednostek repetytywnych **AAGG** nie są one liczone przy nazywaniu alleli [57, 58]. Dwulokusowy system **DYS385** stanowi część haplotypu minimalnego. Standardowa amplifikacja **DYS385** dostarcza dwóch produktów PCR, których nie można jednoznacznie przypisać żadnemu z loci. Obecnie możliwa jest oddzielna analiza obu loci [83], ale z uwagi na niewielki wpływ na dyskryminację haplotypów minimalnych oraz fakt, iż wiąże się to z amplifikacją produktów wielkości 700–780 bp, nie wydaje się, aby tego typu analiza zyskała większe zastosowanie w genetyce sądowej [105]. Zidentyfikowano 27 alleli **DYS385**, w tym 18 alleli o regularnej liczbie powtórzeń w zakresie 7–24, allele 28 i 41 oraz 7 mikrowariantów w zakresie 11.2–17.2 [YHRD, edycja 17].

DYS388

Locus **DYS388** zlokalizowane jest na długim ramieniu chromosomu Y [23]. Allele o powtórzeniach jednostki trójnukleotydomowej nazywane są w oparciu o motyw $(ATT)_n$ [35]. Znanych jest 11 alleli tego locus w zakresie 8–18 [100, 151].

DYS389

System **DYS389** mieści się na długim ramieniu chromosomu Y [23] i obejmuje dwa loci o czteronukleotydomowych powtórzeniach i motywie $(TCTG)_n(TCTA)_nN_{28}$ $(TCTG)_3(TCTA)_n$. Odcinek 28 nukleotydów między tymi loci zawiera sekwencję komplementarną do startera *forward*, dzięki czemu amplifikacja tego systemu dostarcza

dwóch fragmentów: fragmentu DYS389II, obejmującego całą sekwencję, oraz fragmentu DYS389I, obejmującego wyłącznie drugi blok $(TCTG)_3(TCTA)_n$ [139]. Oba systemy wchodzi w skład haplotypu minimalnego. Odjęcie liczby powtórzeń locus DYS389I od łącznej liczby powtórzeń DYS389II pozwala na obliczenie liczby powtórzeń drugiego z loci, określanego często jako DYS389II-I. W przypadku systemu DYS389I znanych jest 10 alleli w zakresie 9–17, w tym 1 allel pośredni (DYS389I*13.2), zaś w systemie DYS389II znaleziono 12 różnych alleli w zakresie 24–35 [YHRD, edycja 17].

DYS390

Locus DYS390 zlokalizowane jest na długim ramieniu chromosomu Y [23]. Składa się z czteronukleotydowych jednostek o złożonej strukturze $(TCTA)_2(TCTG)_n(TCTA)_n(TCTG)_n(TCTA)_nTCA(TCTA)_2$, przy czym niewykazujące polimorfizmu bloki $(TCTA)_2$ na początku sekwencji oraz $TCA(TCTA)_2$ na jej końcu nie są uwzględniane przy nazywaniu alleli [57]. System ten stanowi część haplotypu minimalnego. Zidentyfikowano 14 alleli tego locus: DYS390*12 oraz 13 alleli w zakresie 17–29 [YHRD, edycja 17].

DYS391

Na długim ramieniu chromosomu Y mieści się również locus DYS391 [23], obejmujące czteronukleotydowe powtórzenia o motywie $(TCTG)_3(TCTA)_n$, przy czym jednostki TCTG nie są liczone przy nazywaniu alleli [57]. System ten jest jednym z 9 loci tworzących haplotyp minimalny. Znanych jest 10 alleli tego locus w zakresie 6–15 [YHRD, edycja 17].

DYS392

Locus DYS392 zlokalizowane jest na długim ramieniu chromosomu Y [23], składa się z wielokrotnie powtórzonych jednostek trójnukleotydowych $(TAT)_n$ [57] i wchodzi w skład haplotypu minimalnego. W przypadku tego systemu wykazano obecność 13 alleli w zakresie 6–18 [YHRD, edycja 17].

DYS393

Na krótkim ramieniu chromosomu Y położone jest locus DYS393 [23], obejmujące powtórzenia czteronukleotydowe o motywie $(AGAT)_n$ [57]. Marker zidentyfikowany jako DYS395 jest tożsamy z DYS393 [51]. Na chromosomie X zidentyfikowano locus

homologiczne do DYS393 o motywie TATA(GATA)_nGACA(GATA), które wraz z odpowiadającym mu locus na chromosomie Y określa się jako DXYS267 [47]. Locus DYS393 wchodzi w skład haplotypu minimalnego. Dotychczas zaobserwowano 11 różnych alleli DYS393, w tym 9 alleli w zakresie 9–17 oraz allele DYS393*7 i DYS393*12.2 [YHRD, edycja 17].

DYS426

Locus DYS426 leży na długim ramieniu chromosomu Y [29] i składa się z wielokrotnie powtórzonych jednostek trójnukleotydydowych (GTT)_n [35]. Znanych jest 5 alleli tego systemu w zakresie 9–13 [156].

DYS437

Na długim ramieniu chromosomu Y leży locus DYS437 [23], znane także jako DYS457 [173]. Składa się z czteronukleotydydowych jednostek o złożonej strukturze (TCTA)_n(TCTG)₁₋₃(TCTA)₄ [58]. W locus DYS437 stwierdzono występowanie 6 różnych alleli w zakresie 13–18 [156].

DYS438

System DYS438 mieści się na długim ramieniu chromosomu Y [23] i obejmuje powtórzenia pięcionukleotydydowe o motywie (TTTTTC)₁(TTTTTA)₀₋₁(TTTTTC)_n [58]. Jest jednym z dwóch loci, które zastąpiły dwulokusowy system YCAII w bazie danych YHRD, i obecnie wchodzi w skład haplotypu rozszerzonego. Znanych jest 11 alleli tego systemu w zakresie 7–15, w tym 2 mikrowarianty: DYS438*11.2 i DYS438*13.2 [YHRD, edycja 17].

DYS439

Locus DYS439 zlokalizowane jest na długim ramieniu chromosomu Y [23] i charakteryzuje się obecnością wielokrotnie powtórzonych jednostek czteronukleotydydowych (GATA)_n [58]. Niezależnie opisane locus GATA A4 jest tożsame z DYS439 [55]. Razem z DYS438 system ten zastąpił YCAII w bazie danych YHRD i obecnie tworzy haplotyp rozszerzony. Zidentyfikowano 11 alleli DYS439, w tym 10 alleli w zakresie 8–17 oraz allel DYS439*5 [YHRD, edycja 17].

DYS460

Na długim ramieniu chromosomu Y zlokalizowane jest również locus **DYS460**, znane wcześniej jako **GATA A7.1** [23]. Marker ten razem z sąsiednim locus **DYS461**, znanym uprzednio jako **GATA A7.2**, wchodzi w skład większego fragmentu, określanego niekiedy jako **GATA A7**. Allele o powtórzeniach jednostki czteronukleotydowej nazywane są w oparciu o motyw $(ATAG)_n$ [58]. Znanych jest 8 alleli **DYS460** o regularnej liczbie powtórzeń w zakresie 6–13 [61, 149].

GATA H4.1

System **GATA H4** mieści się na długim ramieniu chromosomu Y [29] i obejmuje 2 loci: **GATA H4.1** i **GATA H4.2**, o powtórzeniach czteronukleotydowych i motywie $(AGAT)_4CTAT(AGAT)_2(AGGT)_3(AGAT)_nN_{24}(ATAG)_4(ATAC)_1(ATAG)_2$. Obejmujące 7 jednostek repetytywnych locus **GATA H4.2** nie wykazuje u ludzi polimorfizmu VNTR [58]. Zidentyfikowano 7 alleli **GATA H4** w zakresie 24–30 [61].

YCAII

System **YCAII** obejmuje 2 loci położone na długim ramieniu chromosomu Y o dwunukleotydowej jednostce repetytywnej $(CA)_n$ [153]. Obok **DYS288** oraz dwulokusowych markerów **YCAI** i **YCAIII** (**DYS413**) jest jednym z czterech znanych systemów mikrosatelitarnych chromosomu Y o powtórzeniach dwunukleotydowych [76, 77]. Standardowa amplifikacja **YCAII** dostarcza dwóch produktów PCR, których podobnie jak w przypadku **DYS385** nie można jednoznacznie przypisać żadnemu z loci. Do 2004 r. marker ten wchodził w skład haplotypu rozszerzonego [137]. Zidentyfikowano 11 różnych alleli **YCAII**, w tym 10 alleli w zakresie 16–25 oraz allel **YCAII*11** [124].

2. CELE PRACY

1. Optymalizacja warunków jednoczesnej amplifikacji, rozdziału, detekcji i oznaczania alleli 18 loci STR ludzkiego chromosomu Y przy zastosowaniu kompleksowej reakcji PCR i elektroforezy kapilarnej.
2. Analiza polimorfizmu haplotypów 18 loci Y-STR w trzech blisko spokrewnionych populacjach słowiańskich Europy Środkowo-Wschodniej: polskiej, słowackiej i białoruskiej.
3. Ocena homogeniczności polimorfizmu badanych mikrosatelitów chromosomu Y w porównywanych populacjach i oszacowanie możliwości stworzenia wspólnej bazy danych haplotypów Y-STR dla tychże populacji.
4. Odniesienie zmienności haplotypów Y-STR w obrębie porównywanych populacji do łączących je związków językowych, kulturowych i historycznych.
5. Ocena przydatności badanego multipleksu w genetyce sądowej w ustalaniu pokrewieństwa.

3. MATERIAŁY

3.1. MATERIAŁ BIOLOGICZNY

- DNA izolowany z materiału biologicznego (krew / nabłonek jamy ustnej) pobranego od 208 niespokrewnionych Polaków, osób dochodzących pokrewieństwa i stron procesowych w sprawach spornego ojcostwa, z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Gdańsku
- DNA 164 niespokrewnionych Słowaków, dostarczony przez Zakład Genetyki Eksperymentalnej i Stosowanej Instytutu Medycyny Prewencyjnej i Klinicznej przy Słowackim Uniwersytecie Medycznym w Bratysławie we współpracy z Katedrą Antropologii Wydziału Nauk Przyrodniczych przy Uniwersytecie Komeńskiego w Bratysławie
- DNA 196 niespokrewnionych Białorusinów, posegregowanych według zamieszkiwanych przez nich regionów etnograficznych [Alaksiej I. Mikulicz, informacja ustna], dostarczony przez Instytut Naukowo-Badawczy Problemów Kryminologii, Kryminalistyki i Ekspertyz Sądowych w Mińsku we współpracę z Instytutem Nauk o Sztuce, Etnografii i Folkloru im. Kandrata Krapiwy Państwowej Akademii Nauk w Mińsku, w tym DNA izolowany z materiału pobranego od:
 - 71 mężczyzn z południowej Białorusi (Polesie)
 - 72 mężczyzn ze środkowej Białorusi
 - 53 mężczyzn z północnej Białorusi (dorzecze Dźwiny)
- DNA izolowany z nabłonka jamy ustnej mężczyzn biorących udział w badaniu genealogicznym, dostarczony przez Katedrę i Zakład Medycyny Sądowej Akademii Medycznej im. prof. Feliksa Skubiszewskiego w Lublinie

3.2. ODCZYNNIKI

1,4-diakryloilopiperazyna	Bio-Rad Laboratories
akrylamid	Serva
azotan srebra	Merck
biekit bromofenolowy	Sigma
bufor do elektroforezy kapilarnej (10x)	Applied Biosystems
bufor do reakcji PCR (10x)	Applied Biosystems, Promega
Chelex 100	Sigma
CHES	Sigma
chlerek magnezu	Sigma
chlerek magnezu do reakcji PCR (25 mM)	Applied Biosystems, Promega
chlerek potasu	Sigma
chlerek sodu	Sigma
DNA AmpFISTR 007	Applied Biosystems
dNTP	Pharmacia Biotech
dodecylosiarczan sodu	Sigma
etanol	POCH
formaldehyd 37%	POCH
formamid dejonizowany	Applied Biosystems
glicerol	POCH
izopropanol	POCH
kwaz azotowy	POCH
kwaz borowy	Sigma
kwaz mrówkowy	POCH
kwaz octowy	POCH
kwaz solny	POCH
nadsiarczan amonu	Sigma
octan sodu	Sigma
PicoGreen	Molecular Probes
polimer POP-4	Applied Biosystems
polimer POP-6	Applied Biosystems
polimeraza DNA AmpliTaq Gold	Applied Biosystems
polimeraza DNA Taq	Promega
standard wielkości GeneScan-500 TAMRA	Applied Biosystems
standard wielkości pGEM	Promega
standardy barwników do macierzy DS-01	Applied Biosystems
standardy barwników do macierzy DS-34	Applied Biosystems
startery niezakowane	Integrated DNA Technologies, Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN
startery znakowane fluorescencyjnie	Integrated DNA Technologies, Metabion International
TEMED	Serva
Tris	Sigma
Triton X-100	Roth
wersenian disodu	Sigma
węglan sodu	POCH

3.2.1. ZESTAWY ODCZYNNIKOWE

ABI Prism BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
PowerPlex Y	Promega
Sherlock AX	A&A Biotechnology
Yfiler	Applied Biosystems
Y-PLEX 12	Reliagene Technologies

3.3. SKŁAD ROZTWORÓW

bufor łącznikowy	0,52 M Tris, 0,14 M kwas borowy (pH 9,0)
roztwór wywołujący	3% węglan sodu, 0,1% formaldehyd
TE (pH 8,0)	10 mM Tris / HCl (pH 8,0), 1 mM wersenian disodu
TKM1	10 mM Tris / HCl (pH 7,6), 10 mM chlorek potasu, 10 mM chlorek magnezu, 2 mM wersenian disodu
TKM2	10 mM Tris / HCl (pH 7,6), 10 mM chlorek potasu, 10 mM chlorek magnezu, 0,4 M chlorek sodu, 2 mM wersenian disodu

3.4. PROGRAMY KOMPUTEROWE I INTERNETOWE BAZY DANYCH

Arlequin 2.000	[Schneider et al. 2000]
Ascent Software 2.6	Thermo Labystems
BLAST 2.2.12	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
ClustalX 1.81	[Thompson et al. 1997]
DNA-VIEW 27.05	[Brenner 2005]
GeneScan 3.7	Applied Biosystems
Microsoft Office Excel 2003	Microsoft Corporation
MRCA Calculator Beta 0.1	[Turner 2001]
NanoDrop 3.1.0	Coleman Technologies
NETWORK 4.1.0.8	Fluxus Technology
Sequencing Analysis 3.7	Applied Biosystems
STATISTICA 6.1	StatSoft
Utility Programs for Analysis of Genetic Linkage	[Ott 2001]
Vector NTI 3.1	InforMax
Y-Haplogroup Predictor 3.13	http://home.comcast.net/~whitathey/predictorinstr.htm
YHRD 17	http://www.ystr.org/

4. METODY

4.1. IZOLACJA DNA

4.1.1. IZOLACJA DNA Z KRWI OBWODOWEJ

Genomowy DNA z pełnej krwi izolowano przy użyciu metody nieenzymatycznej [88] z niewielkimi modyfikacjami. Do 500 µl krwi obwodowej pobranej na wersenian dodawano 500 µl buforu TKM1 i 12,5 µl detergentu niejonowego Triton X-100 w celu lizy komórek. Całość mieszano dokładnie poprzez wielokrotne obracanie probówki do momentu widocznego rozpuszczenia detergentu, a następnie wirowano przez 10 min przy 2200 rpm. Po odrzuceniu supernatantu kilkakrotnie powtarzano płukanie osadu 500 µl buforu TKM1 i wirowanie, dopóki osad nie przyjmował białego zabarwienia. Następnie osad zawieszano w 80 µl buforu TKM2 i dodawano 5 µl 10% dodecylosiarczanu sodu. Po ostrożnym wymieszaniu przez pipetowanie i 10-minutowej inkubacji w temperaturze 55 °C dodawano 30 µl 6 M NaCl i dokładnie mieszano. Po odwirowaniu osadu przez 5 min przy 12000 rpm do supernatantu dodawano 2 objętości 100% etanolu. Probówkę obracano kilkakrotnie do momentu precypitacji DNA, po czym wirowano przez 5 min przy 12000 rpm, odrzucano supernatant, zaś osad po wysuszeniu w temperaturze pokojowej zawieszano w 100 µl buforu TE (pH 8,0) w temperaturze 65 °C.

4.1.2. IZOLACJA DNA Z NABŁONKA JAMY USTNEJ

Do izolacji DNA z wymazów nabłonka jamy ustnej stosowano zestaw Sherlock AX (A&A Biotechnology). Wacik z wymazem umieszczano w probówce, do której uprzednio dodano 300 µl buforu TE (pH 8,0), 300 µl buforu lizującego L 1.4 i 20 µl roztworu proteiny K o stężeniu 20 mg/ml. Całość worteksowano i inkubowano 2 h w 55 °C, po czym nanoszono na kolumnę oczyszczającą i wirowano przez 1 min przy 5000 rpm. Przesącz wylewano, dodawano 600 µl roztworu płuczającego K2 i wirowano przez 1 min przy 5000 rpm. Płukanie powtarzano, po czym dodawano 400 µl roztworu elucyjnego K3, inkubowano 3 min w temperaturze pokojowej i wirowano przez 1 min przy 5000 rpm. Ponownie dodawano 400 µl roztworu elucyjnego K3 i wirowano przez 1 min przy 5000 rpm. Do eluatu dodawano 5 µl wzmacniacza precypitacji i 700 µl izopropanolu, całość worteksowano i inkubowano

5 min w temperaturze pokojowej. Próbkę wirowano przez 15 min przy 12000 rpm, odrzucono supernatant i dodawano 500 μ l 70% etanolu. Po wymieszaniu wirowano przez 5 min przy 12000 rpm. Osad po wysuszeniu w temperaturze pokojowej zawieszano w 25 μ l buforu TE (pH 8,0) w temperaturze 65 °C.

4.1.3. ELUCJA DNA Z ŻELU POLIAKRYLAMIDOWEGO

Po elektroforezie i wybarwieniu DNA żel poliakrylamidowy intensywnie płukano dejonizowaną wodą. Jałowym skalpelem wycinano fragment żelu z prążkiem zawierającym badany allel, wybarwiony srebrem, dodawano 200 μ l 5% zawiesiny żywicy Chelex 100 [59], po czym całość inkubowano przez 30 min w temperaturze 55 °C. Po worteksowaniu wirowano przy 15000 rpm przez 3 min. Do amplifikacji w 20 μ l pobierano 1 μ l supernatantu. Pozostałą część przechowywano w -20 °C, zaś przed kolejnym użyciem próbkę worteksowano i ponownie wirowano.

4.2. OZNACZANIE STĘŻENIA DNA

4.2.1. METODA FLUORYMETRYCZNA

Jedną z metod używanych w pracy do pomiaru stężenia izolowanego DNA lub oczyszczonego produktu PCR była metoda fluorymetryczna. Stężenie DNA oznaczano względem wody z użyciem odczynnika PicoGreen, którego fluorescencja intensywnie rośnie po wiązaniu z dwuniciowym DNA [162]. Do 1 μ l wody, standardu o znanym stężeniu lub próbki o badanym stężeniu, umieszczonego w nieprzezroczystej płytce 96-dołkowej, dodawano 99 μ l 400-krotnie rozcieńczonego w wodzie odczynnika PicoGreen. Płytkę umieszczano w automatycznym fluorymetrze Fluoroskan Ascent FL (Thermo Labsystems). Pomiar był poprzedzony 30-sekundowym wytrząsaniem przy 120 rpm o średnicy ruchu 5 mm. Intensywność fluorescencji przeliczano automatycznie na stężenie DNA w stosunku do krzywej wzorcowej stworzonej w oparciu o stężenia 1 ng/ μ l, 10 ng/ μ l i 100 ng/ μ l przy użyciu oprogramowania Ascent Software 2.6 (Thermo Labsystems).

4.2.2. METODA SPEKTROFOTOMETRYCZNA

Stężenie DNA oznaczano również spektrofotometrycznie względem buforu TE (pH 8,0) lub wody w zależności od tego, w czym zawieszony był DNA. Pomiar stężenia próbki o objętości 1 μ l prowadzono na spektrofotometrze NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). Przy długości fali 260 nm absorpcja kwasów nukleinowych wykazuje maksimum, zaś wartość absorbancji dla dwuniciowego DNA równa 1 odpowiada stężeniu 50 ng/ μ l. Stężenie DNA badanych próbek przeliczane było automatycznie przy użyciu oprogramowania NanoDrop 3.1.0 (Coleman Technologies).

4.3. ROZPUSZCZANIE LIOFILIZOWANYCH STARTERÓW

Do próbek z liofilizowanymi starterami dodawano wody dejonizowanej tak, aby ostateczne stężenie startera w roztworze wynosiło 1 mM. Następnie próbki inkubowano przez 2 h w temperaturze 55 °C, po czym przygotowywano odpowiednie rozcieńczenia. Wszystkie roztwory starterów przechowywano w -20 °C.

4.4. REAKCJA PCR

Reakcję PCR przygotowywano przestrzegając rygorystycznie zasad mających na celu zapobieżenie kontaminacji obcym DNA, a w szczególności produktami poprzednich reakcji [116]. Do amplifikacji alleli badanych loci zarówno w formie monopleksu, jak i metodą kompleksowej reakcji PCR w postaci oktadekapleksu (multipleksu 18-lokusowego) stosowano startery o następujących sekwencjach [35]:

- DYS19 **ACTACTGAGTTTCTGTTATAGTGTTTTT**
 GTCAATCTCTGCACCTGGAAAT
- DYS385 **AGCATGGGTGACAGAGCTA**
 GCCAATTACATAGTCCTCCTTTC
- DYS388 **GAATTCATGTGAGTTAGCCGTTTAGC**
 GAGGCGGAGCTTTTAGTGAG
- DYS389 **CCAACTCTCATCTGTATTATCTATG**
 GTTATCCCTGAGTAGTAGAAGAATG

- DYS390 **TATATTTTACACATTTTGGGCC**
GTGACAGTAAAATGAAAACATTGC
- DYS391 **TTCAATCATAACCCATATCTGTC**
GATAGAGGGATAGGTAGGCAGGC
- DYS392 **TAGAGGCAGTCATCGCAGTG**
GACCTACCAATCCCATTCCCTT
- DYS393 **GTGGTCTTCTACTTGTGTCAATAC**
GAACTCAAGTCCAAAAAATGAGG
- DYS426 **CTCAAAGTATGAAAGCATGACCA**
GGTGACAAGACGAGACTTTGTG
- DYS437 **GACTATGGGCGTGAGTGCAT**
GAGACCCTGTCATTCACAGATGA
- DYS438 **CCAAAATTAGTGGGAATAGTTG**
GATCACCCAGGGTCTGGAGTT
- DYS439 **TCGAGTTGTTATGGTTTTAGGTCT**
GTGGCTTGAATTCTTTTACCC
- DYS460 **GAGGAATCTGACACCTCTGACA**
GTCCATATCATCTATCCTCTGCCTA
- GATAH4.1 **ATGCTGAGGAGAATTTCCAA**
GCTATTCATCCATCTAATCTATCCATT
- YCAII **TGTCAAATTTAACCACAATCA**
GCAGTCTTTCACCATAAGGTTAGC

W celu umożliwienia detekcji produktów PCR w oparciu o fluorescencję startery *forward* wszystkich systemów zostały wyznakowane na końcu 5' trzema różnymi barwnikami fluorescencyjnymi:

- 6-FAM (DYS389, DYS391, DYS437, DYS438, DYS439)
- TET (DYS385, DYS390, DYS393, DYS426, YCAII)
- HEX (DYS19, DYS388, DYS392, DYS460, GATA H4.1)

W dalszych badaniach niezbędna okazała się zamiana startera *forward* DYS391 znakowanego 6-FAM na starter znakowany HEX oraz zamiana barwnika HEX użytego do znakowania startera *forward* DYS460 na barwnik 6-FAM.

Czułość multiplexu badano w stosunku do różnej ilości matrycowego DNA. W tym celu do amplifikacji dodawano 0,025–100 ng genomowego DNA mężczyzny, przy czym stosowano zarówno rozcieńczenia izolowanego DNA o stężeniu oznaczonym dostępnymi metodami, jak i kontrolny DNA AmpFISTR 007 (Applied Biosystems) o znanym stężeniu równym 0,10 ng/μl.

Do amplifikacji locus DYS19 w celu późniejszej elektroforezy poliakrylamidowej i detekcji poprzez barwienie srebrem stosowano alternatywną parę starterów o następujących sekwencjach:

GTGTTATATATATATAGTGTTTTA	[181]
ATGGCCATGTAGTGAGGACA	[YHRD, edycja 12]

Amplifikację prowadzono w termocyklerze Mastercycler Gradient (Eppendorf) z pokrywą wstępnie ogrzaną do 110 °C i prędkością zmiany temperatury równą 1 °C/s. Reakcja przebiegała w 5 μl mieszaniny zawierającej odpowiedni bufor (10 mM Tris / HCl (pH 8,3), 50 mM KCl), 1,75 mM MgCl₂, 300 μM dNTP, 5% (obj./obj.) glicerol, 0,5 jednostki polimerazy DNA AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), startery w zoptymalizowanych stężeniach oraz 10 ng lub 0,2 ng genomowego DNA mężczyzny.

Program temperaturowy kompleksowej reakcji PCR obejmował 10-minutową wstępną denaturację w 95 °C, 28 cykli amplifikacji (1 min w 94 °C, 1 min w 55 °C oraz 1 min w 72 °C) oraz 45-minutową końcową elongację w 60 °C [35]. Pojedyncze systemy amplifikowano w identycznych warunkach z wyjątkiem całkowitej objętości równiej 10–20 μl oraz cykli amplifikacji, których liczbę zwiększano do 32. W przypadku DNA eluowanego z żelu poliakrylamidowego do amplifikacji w całkowitej objętości 20 μl dodawano 1 μl eluatu.

W przypadku alternatywnej pary starterów dla DYS19 reakcję prowadzono w 10 μl mieszaniny zawierającej odpowiedni bufor (10 mM Tris / HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100), 1,5 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, 0,4 jednostki polimerazy DNA *Taq* (Promega), 0,5 μM startery oraz 5–20 ng genomowego DNA mężczyzny. Program temperaturowy obejmował 10-minutową wstępną denaturację w 94 °C, 30 cykli amplifikacji (1,5 min w 94 °C, 0,5 min w 55 °C oraz 0,5 min w 72 °C) oraz 10-minutową końcową elongację w 72 °C [129].

4.5. REAKCJA SEKWENCJONOWANIA

W przypadku systemów dwulokusowych sekwencjonowane allele wstępnie izolowano metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (5,4% w przypadku DYS385 lub 7,2% w przypadku YCAII), po czym poddawano elucji i amplifikacji. Produkt reakcji PCR sekwencjonowanego allelu oczyszczano ze starterów i nukleotydów na kolumnie Microcon YM-30 lub YM-100 (Millipore). Do całości amplifikatu dodawano 480 μ l wody i poddawano zagęszczaniu. Uzyskany koncentrat uzupełniano 450 μ l wody i ponownie zagęszczano, po czym oznaczano stężenie oczyszczonego produktu PCR metodą fluorymetryczną lub spektrofotometryczną. Reakcję sekwencjonowania prowadzono przy użyciu zestawu ABI Prism BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit we wspomnianym termocyklerze. Do sekwencjonowania używano 1–10 ng produktu PCR oraz 1,6 pmol nieznakowanego fluorescencyjnie startera w łącznej objętości 10 μ l. W przypadku systemu DYS389 stosowano wyłącznie starter *forward*. Profil termiczny obejmował 2 min wstępnej denaturacji w 96 °C oraz 30 cykli reakcji wydłużania startera (0,5 min w 96 °C, 0,25 min w 50 °C, 4 min w 60 °C). Szybkość zmiany temperatury pomiędzy poszczególnymi etapami ustawiono na 1 °C/s.

4.6. PRECYPITACJA PRODUKTÓW SEKWENCJONOWANIA

4.6.1. PRECYPITACJA IZOPROPANOLEM

Do produktów reakcji sekwencjonowania dodawano 10 μ l wody i 30 μ l izopropanolu, całość wortexowano i inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej. Probówkę wirowano przez 20 min przy 15000 rpm, usuwano supernatant, zaś do osadu dodawano 93,75 μ l izopropanolu i 31,25 μ l wody i ponownie wortexowano. Po 5-minutowym wirowaniu przy 15000 rpm usuwano supernatant, zaś osad suszono w bloku grzejnym w 90 °C przez 1 min i dodawano 10 μ l dejonizowanego formamidu [5].

4.6.2. PRECYPITACJA 59% ETANOLEM W OBECNOŚCI OCTANU SODU

Do mieszaniny składającej się z 31,25 μ l 95% etanolu, 7,25 μ l dejonizowanej wody oraz 1,5 μ l 3 M octanu sodu (pH 5,2) dodawano produkty reakcji sekwencjonowania, całość wortexowano i inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej. Probówkę wirowano przez 20 min przy 15000 rpm, usuwano supernatant, zaś do osadu dodawano 125 μ l 70%

etanolu i ponownie worteksowano. Po 5-minutowym wirowaniu przy 15000 rpm usuwano supernatant, zaś osad suszono w bloku grzejnym w 90 °C przez 1 min i dodawano 10 µl dejonizowanego formamidu [8].

4.6.3. PRECYPITACJA 66% ETANOLEM W OBECNOŚCI OCTANU SODU

Do mieszaniny składającej się z 25 µl 95% etanolu i 1 µl 3 M octanu sodu (pH 5,2) dodawano produkty reakcji sekwencjonowania, całość worteksowano i inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej. Probówkę wirowano przez 20 min przy 15000 rpm, usuwano supernatant, zaś do osadu dodawano 125 µl 70% etanolu i ponownie worteksowano. Po 5-minutowym wirowaniu przy 15000 rpm usuwano supernatant, zaś osad suszono w bloku grzejnym w 90 °C przez 1 min i dodawano 10 µl dejonizowanego formamidu [5].

4.7. ELEKTROFOREZA KAPILARNA

4.7.1. ELEKTROFOREZA KAPILARNA PRODUKTÓW AMPLIFIKACJI

Do 9,35 µl dejonizowanego formamidu dodawano 0,15 µl wewnętrznego standardu wielkości GeneScan-500 TAMRA (Applied Biosystems) oraz 0,5 µl amplifikatu lub drabiny alleli, po czym próbkę poddawano 5-minutowej denaturacji w 95 °C i umieszczano na 2 min w bloku chłodzącym o temperaturze -20 °C. Produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie przez 28 min w 60 °C przy 15 kV (aparat ABI Prism 310 firmy Applied Biosystems) w kapilarze o wymiarach 47 cm × 50 µm, wypełnionej polimerem POP-4 (Applied Biosystems), przy zastosowaniu zestawu filtrów C.

4.7.2. ELEKTROFOREZA KAPILARNA PRODUKTÓW SEKWENCJONOWANIA

Po worteksowaniu próbkę poddawano 2-minutowej denaturacji w 95 °C, umieszczano na 2 min w bloku chłodzącym o temperaturze -20 °C i ponownie worteksowano. Produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie po nastrzyku przy 2 kV (czas nastrzyku modyfikowano w celu uzyskania odpowiednio silnego sygnału) w kapilarze o wymiarach 47 cm × 50 µm, wypełnionej polimerem POP-6 (Applied Biosystems), przy zastosowaniu modułu szybkiego sekwencjonowania i zestawu filtrów E. Rozdział prowadzono przez 30 min w 50 °C przy 15 kV.

4.8. TWORZENIE PLIKU MACIERZY DO ANALIZY WIELOBARWNIKOWEJ

Do próbek z 12 µl dejonizowanego formamidu dodawano po 1 µl standardów zawierających fragmenty DNA znakowane określonym barwnikiem fluorescencyjnym:

- 6-FAM, TET, HEX, TAMRA (zestaw barwników DS-34) w przypadku zestawu filtrów C i polimeru POP-4
- dR110, dR6G, dTAMRA, dROX (zestaw barwników DS-01) w przypadku zestawu filtrów E i polimeru POP-6.

Próbki poddawano 2-minutowej denaturacji w 95 °C i umieszczano na 2 min w bloku chłodzącym o temperaturze -20 °C. Po nastryku trwającym 5–90 s przy 15 kV fragmenty DNA rozdzielano elektroforetycznie przez 28 min w 50 °C (w przypadku DS-01) lub 60 °C (w przypadku DS-34) przy 15 kV (aparat ABI Prism 310 firmy Applied Biosystems). Czas nastryku modyfikowano tak, aby wszystkie standardy miały porównywalną siłę sygnału fluorescencji. Uzyskane elektroforegramy służyły do tworzenia pliku macierzy przy użyciu programu komputerowego GeneScan 3.7 (Applied Biosystems).

4.9. ANALIZA WYNIKÓW ELEKTROFOREZY KAPILARNEJ

4.9.1. ANALIZA WYNIKÓW GENOTYPOWANIA

Wielkości alleli oznaczano przy użyciu programu komputerowego GeneScan 3.7 (Applied Biosystems) w oparciu o macierz DS-34 i krzywą wzorcową zależności wielkości fragmentów DNA od czasu migracji. Krzywą tę wyznaczano w stosunku do użytego wewnętrznego standardu wielkości GeneScan-500 TAMRA (Applied Biosystems) globalną metodą Southerna w zakresie 75–400 nukleotydów bez fragmentów o wielkości 250 i 340 zasad [84, 141]. Tak oznaczone wielkości wprowadzano w arkusz kalkulacyjny Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation), w celu oszacowania liczby różnych alleli w każdym systemie. Allele nieznanne poddano sekwencjonowaniu w celu nadania im nazwy w oparciu o zalecenia ISFG [51, 57]. W późniejszym etapie badań allele typowano porównując ich wielkość do wielkości fragmentów DNA w drabinie złożonej ze znanych alleli. Allel w badanej próbce oznaczano jako tożsamy z allelem obecnym w drabinie, jeśli różnica między wielkością tego allelu obliczoną przy użyciu programu GeneScan 3.7 (Applied Biosystems) a wielkością porównywanego allelu była mniejsza niż 0,5 nukleotydu.

4.9.2. ANALIZA WYNIKÓW SEKWENCJONOWANIA

Sekwencje alleli odczytywano przy użyciu programu komputerowego Sequencing Analysis 3.7 (Applied Biosystems) w oparciu o macierz DS-01. Sekwencje wzorcowe systemów Y-STR wyszukiwano przy użyciu programu komputerowego BLAST 2.2.12 [3] w bibliotece genowej RPCI-11, zawierającej DNA jądrowy jednego mężczyzny sklonowany w sztucznych chromosomach bakteryjnych (BAC), którego sekwencję zdeponowano w internetowej bazie danych amerykańskiego Krajowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). W tym celu korzystano z opcji „*Search for short, nearly exact matches*”, wpisując sekwencje obu starterów rozdzielone dwudziestoma literami N i ograniczając poszukiwania do sekwencji DNA ludzkiego. Wyniki sekwencjonowania alleli porównywano ze sobą oraz z sekwencjami wzorcowymi przy użyciu programu komputerowego ClustalX 1.81 [174].

4.10. ELEKTROFOREZA POLIAKRYLAMIDOWA I BARWIENIE DNA SREBREM

Produkty amplifikacji rozdzielano w natywnym żelu poliakrylamidowym o grubości 450 μm , zmiennej procentowości oraz stałym stopniu usieciowania równym 3%. Jako czynnik sieciujący stosowano 1,4-diakryloilopiperazynę. Na każde 10 ml żelu przygotowywano mieszaninę składającą się z 1,65 ml 0,5 M buforu mrówczan / Tris (pH 9,0), 1 ml 0,22 M CHES / Tris (pH 9,0) oraz 4 μl TEMED. Pozostałe 7,35 ml stanowiła dejonizowana woda oraz 30% roztwór akrylamidu z 1,4-diakryloilopiperazyną w odpowiedniej, uzależnionej od procentowości żelu proporcji. Tuż przed wylaniem żelu na każde 10 ml mieszaniny dodawano 75 μl 10% nadsiarczanu amonu i pozostawiano do polimeryzacji w temperaturze pokojowej na co najmniej 1 h. Następnie na nałożone na żel skrawki bibuły наносzono po 5 μl każdego amplifikatu oraz standard wielkości DNA pGEM (Promega) lub drabinę alleli. Na obu końcach żelu umieszczano łączniki z trzech warstw papieru do chromatografii CHR 17 (Whatman) nasączonych buforem łącznikowym, do których przykładane były elektrody. Elektroforezę prowadzono w aparacie Multiphor II (Pharmacia LKB) z systemem chłodzenia (10 °C) przy napięciu 1000 V, natężeniu 40 mA oraz mocy 15 W i zatrzymywano w momencie, kiedy błękit bromofenolowy obecny w buforze łącznikowym dosięgał anody.

Po rozdziale elektroforetycznym żel poliakrylamidowy umieszczano na 3 min w 1% kwasie azotowym, przez 10 s płukano wodą dejonizowaną, po czym przez 20 min

inkubowano w 0,1% azotanie srebra. Następnie przez 10 s płukano żel wodą dejonizowaną i umieszczano w schłodzonym (4–10 °C) roztworze wywołującym do momentu, kiedy allele stawały się widoczne (roztwór wymieniano za każdym razem, gdy ulegał on zabarwieniu wytrącającym się srebrem). Reakcję zatrzymywano poprzez dodanie do roztworu wywołującego 10% kwasu octowego na 2 min. Po przepłukaniu wodą dejonizowaną i 5% glicerolem pozostawiano żel do wyschnięcia w temperaturze pokojowej.

4.11. KONSTRUKCJA DRABINY ALLELI

W celu stworzenia drabiny allele każdego systemu nazwane w oparciu o wyniki sekwencjonowania amplifikowano oddzielnie w opisanych uprzednio warunkach poza tym, że reakcja przebiegała w 5 µl przy 30 cyklach amplifikacji. Allele tego samego systemu po amplifikacji mieszano w jednakowym stosunku, uzupełniano do 500 µl buforem TE (pH 8,0) i zagęszczano na kolumnkach Microcon YM-30 (Millipore) do objętości ok. 10 µl. Po oszacowaniu siły sygnału fluorescencji poszczególnych drabin metodą elektroforezy kapilarnej przy zastosowaniu polimeru POP-4 (Applied Biosystems) i zestawu filtrów C, drabiny te łączono w stosunku obliczonym w celu uzyskania zrównoważonego sygnału fluorescencji dla wszystkich systemów.

4.12. KONTROLA JAKOŚCI

Poprawność genotypowania loci Y-STR dla haplotypów rozszerzonych zweryfikowano poprzez udział w teście kontroli jakości organizowanym przez Instytut Medycyny Sądowej przy Wydziale Medycznym (Charité) berlińskich uniwersytetów: Uniwersytetu Humboldta i Wolnego Uniwersytetu w Berlinie (<http://www.ystr.org/>). Dodatkowo w przypadku 35 próbek DNA allele trzech mikrosatelitów (DYS390, DYS392, DYS393) oznaczono metodą kompleksowej reakcji PCR i elektroforezy w natywnych żelach poliakrylamidowych [129]. W przypadku kilku próbek genotypy oznaczono również stosując komercyjne zestawy: Y-PLEX 12 (Reliagene Technologies), PowerPlex Y (Promega) oraz Yfiler (Applied Biosystems) w oparciu o instrukcje dostarczone przez producentów [11, 121, 128].

4.13. KOMPUTEROWA ANALIZA KOMPATYBILNOŚCI STARTERÓW

Możliwość formowania dimerów przez startery zbadano przy pomocy programu komputerowego Vector NTI 3.1 (InforMax). Z menu „*Oligo/Primers*” wybierano opcję „*Oligo Duplexes...*”, wprowadzano sekwencję DNA analizowanych oligonukleotydów, a następnie oceniano energię i strukturę tworzonych przez startery dimerów w temperaturze 55 °C. Dodatkowo przy użyciu programu komputerowego BLAST 2.2.12 [3] sprawdzano specyficzność amplifikacji w oparciu o sekwencje ludzkiego genomu zdeponowane w internetowej bazie danych NCBI.

4.14. ANALIZA STATYSTYCZNA

We wszystkich obliczeniach DYS389 oznaczał haplotyp dwóch niezależnych loci: DYS389I (jednostki repetytywne: $p+q$) i DYS389II-I (jednostki repetytywne: $m+n$) [139].

4.14.1. ANALIZA WEWNĄTRZPOPULACYJNA

Częstości p_i alleli badanych loci Y-STR oraz zdefiniowanych przez nie haplotypów obliczono na podstawie wzoru:

$$p_i = \frac{x_i}{n}$$

x_i – liczba obserwacji w próbie allelu lub haplotypu i

n – łączna liczba obserwacji (liczba osobników)

Zróżnicowanie genetyczne H jest zdefiniowane jako prawdopodobieństwo, że dwa losowo wybrane z próby allele lub haplotypy będą różne, i w przypadku systemów sprzężonych z chromosomem Y odpowiada sile dyskryminacji, rozumianej jako prawdopodobieństwo wylosowania dwóch różnych genotypów, oraz szansie wykluczenia mężczyzny niesłusznie pozwanego o ojcostwo. Do jego obliczeń wykorzystano program Arlequin 2.000 [155], a wyrażone jest ono wzorem:

$$H = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2\right) \quad [155]$$

k – liczba alleli lub haplotypów

Zdolność do dyskryminacji (ZD; ang. „*discrimination capacity*”) obliczono jako stosunek różnych haplotypów do łącznej liczby haplotypów w danej próbie, wyrażony w procentach. Podobnie oszacowano odsetek pojedynczych (obserwowanych tylko raz w badanej próbie) haplotypów (OPH). Udział każdego systemu w ZD obliczono jako różnicę między ZD pełnego multipleksu a ZD multipleksu po wyłączeniu badanego markera, podzieloną przez ZD pełnego multipleksu i wyrażoną w procentach [131].

4.14.2. ANALIZA MIĘDZYPOPULACYJNA

Analizę homogeniczności rozkładu alleli badanych systemów pomiędzy badanymi populacjami przeprowadzono przy zastosowaniu testu chi-kwadrat w oparciu o program komputerowy CONTING 2.81 z pakietu Utility Programs for Analysis of Genetic Linkage [109] oraz przy zastosowaniu analizy wariancji molekularnej (AMOVA) „*locus-by-locus*” w oparciu o program komputerowy Arlequin 2.000 [155]. W analizie AMOVA „*locus-by-locus*” wyniki genotypowania systemów Y-STR oznaczono w programie jako dane standardowe.

Zmienność międzypopulacyjną haplotypów oszacowano na podstawie statystyki F (F_{ST}), która wyrażona jest wzorem:

$$F_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2} \quad [136]$$

σ_a^2 – międzypopulacyjna wariancja molekularna

σ_T^2 – całkowita wariancja molekularna (suma międzypopulacyjnej i wewnątrzpopulacyjnej wariancji molekularnej)

Dla populacji jednorodnych międzypopulacyjna wariancja molekularna, a tym samym statystyka F przyjmuje wartość 0.

Wartości F_{ST} dla par porównywanych populacji obliczono metodą AMOVA, zaś odpowiadające im wartości P, testujące $\{F_{ST} = 0\}$ względem $\{F_{ST} > 0\}$, oszacowano w oparciu o 10100 permutacji haplotypów między populacjami, korzystając z programu Arlequin 2.000 [155]. Dodatkowo do obliczeń włączono haplotypy minimalne innych populacji słowiańskich, dwóch populacji bałtyckich oraz populacji węgierskiej i tureckiej. Dane zaczerpnięto z internetowej bazy danych YHRD [137] oraz z piśmiennictwa [89, 95, 113, 114, 165].

W analizie AMOVA wyniki genotypowania systemów Y-STR oznaczono w programie jako dane mikrosatelitarne, przy czym w przypadku systemów dwulokusowych allele przypisywano dwóm różnym loci w zależności od wielkości allelu (krótszy allel przypisywano locus DYS385a lub YCAIIa, zaś dłuższy allel locus DYS385b lub YCAIIb). Ciche allele i duplikacje loci oznaczono w programie jako brakujące dane. Uzyskane wartości F_{ST} wykorzystano w analizie metodą skalowania wielowymiarowego z użyciem oprogramowania STATISTICA 6.1 (StatSoft).

Sieć jednokrokowych mutacji dzielących poszczególne haplotypy obejmujące wybrane loci Y-STR konstruowano w oparciu o program komputerowy NETWORK 4.1.0.8 (Fluxus Technology) obliczając sieć typu „*median-joining network*”. Najczęstszym haplotypom w sieci „*median-joining network*” przypisano odpowiadające im haplogrupy metodą częstości alleli [12] w oparciu o program Y-Haplogroup Predictor 3.13. Zbiór modalny dla haplogrupy zdefiniowano jako wszystkie haplotypy modalne dla danej haplogrupy oraz haplotypy różniące się o jedno powtórzenie jednostki repetytywnej w badanych systemach mikrosatelitarnych od haplotypu modalnego.

Częstości zbiorów modalnych dla haplogrup w różnych populacjach porównano przy zastosowaniu testu chi-kwadrat w oparciu o program komputerowy CONTING 2.81 [109]. Różnice w rozkładzie częstości alleli w zbiorze modalnym dla danej haplogrupy oszacowano przy zastosowaniu dokładnego testu Fishera w oparciu o program komputerowy 2BY2 [109].

4.14.3. BADANIE POKREWIEŃSTWA

Wartość ilorazu wiarygodności (LR) dla testowanych hipotez zakładających i wykluczających pokrewieństwo porównywanych osób obliczono korzystając z programu komputerowego DNA·VIEW 27.28 [24] w oparciu o częstości alleli mikrosatelitów autosomalnych w populacji polskiej [171, 172].

Wartość LR w przypadku haplotypu chromosomu Y obliczono jako odwrotność jego częstości, wyznaczonej wzorem $(k + 1)/(n + 1)$, gdzie k oznacza liczbę obserwacji danego haplotypu, zaś n oznacza liczbę zbadanych haplotypów [163]. Częstości oczekiwane haplotypów chromosomu Y obliczono jako odwrotność wartości „*estimated odds*” obliczonej przy użyciu programu DNA·VIEW 27.28 [24] dla 208 niespokrewnionych mężczyzn z populacji polskiej [131]. Częstości obserwowane haplotypów minimalnych w wybranych populacjach europejskich wyznaczano korzystając z internetowej bazy danych YHRD [137].

Prawdopodobieństwo pokrewieństwa porównywanych osób w oparciu o wyniki badań genetycznych wyznaczono korzystając z wzoru:

$$W = \frac{1}{1 + \frac{1-P}{P \times LR}} \quad [20]$$

W – prawdopodobieństwo pokrewieństwa a posteriori

P – prawdopodobieństwo pokrewieństwa a priori

LR – iloraz wiarygodności

Sieć jednokrokowych mutacji (ang. „*single step mutation*”) dzielących poszczególne haplotypy konstruowano w oparciu o program Network 4.1.0.8 (Fluxus Technology) obliczając sieć typu „*median-joining network*”. W przypadku systemów DYS385 i YCAII allele przypisywano dwóm różnym loci w zależności od wielkości allelu (krótszy allel przypisywano locus DYS385a lub YCAIIa, zaś dłuższy allel locus DYS385b lub YCAIIb). Allele o nieregularnej liczbie powtórzeń traktowano jako allele nieoznaczone.

Liczbę pokoleń dzielących porównywane haplotypy obliczano w oparciu o metodę zaproponowaną przez Bruce’a Walsh [178] przy założeniu modelu nieograniczonych alleli (ang. „*infinite allele model*”) jako modelu mutacji i częstości mutacji dla wszystkich systemów równej 0,002 [62, 68], korzystając z programu komputerowego MRCA Calculator Beta 0.1 [175].

Prawdopodobieństwo pokrewieństwa w badaniu genealogicznym oceniano na podstawie wyników analizy 18 loci Y-STR zgodnie z procedurą opisaną przez zespół Family Tree DNA [65].

5. WYNIKI

5.1. NAZEWNICTWO SYSTEMÓW Y-STR

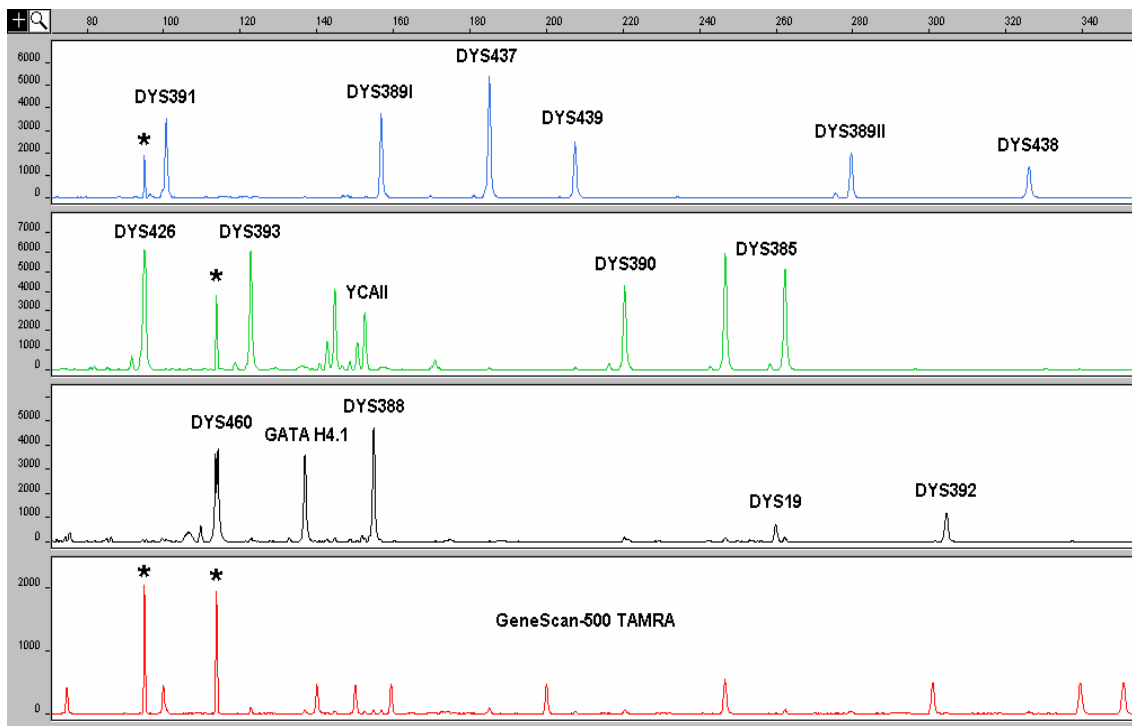
W przypadku wszystkich systemów Y-STR przyjęto nazewnictwo markerów zgodnie z zaleceniami ISFG [57]. W systemie GATA H4 konieczne okazało się określenie sekwencji, która ulega amplifikacji przy użyciu pary starterów stosowanej z pracy. Wykazano, że niepolimorficzne locus GATA H4.2 leży poza zasięgiem sekwencji rozpoznawanej przez używane startery (ryc. 4.), dlatego system ten określano w pracy jako GATA H4.1, którego allele są krótsze o 7 jednostek repetytywnych od opisywanych alleli GATA H4.

```
1  GAGACCTAAG CAGAGATGTT GGTTCCTGA TACACATTGA TACTTTCAGC
51 ACATCACTTG TATCCTAGGA ATCATCATTA AAATGTTATG CTGAGGAGAA
101 TTTCCAAATT TAAGATAGAT AGATAGATCT ATAGATAGAT AGGTAGGTAG
151 GTAGATAGAT AGATAGATAG ATAGATAGAT AGATAGATAG ATAGATAGAA
201 TGGATAGATT AGATGGATGA ATAGATAGAT AGATAGATAC ATAGATAGGT
251 GATTTATCCT GTTAAGTTGT TTAACAAGTG GGCTATGTAA AATTTTACTA
301 ATATTTAAAC ATAAGTAGTT TGTAGATTTT CTTATTTATT TCTAATTCCA
351 TTACTTCACC ATCAGAGG
```

Ryc. 4. Sekwencja wzorcowa locus GATA H4 z biblioteki genowej RPCI-11. Pokreślono motyw jednostek repetytywnych (AGAT)₄CTAT(AGAT)₂(AGGT)₃(AGAT)₁₁ locus GATA H4.1 (allel GATA H4.1*21) oraz motyw jednostek repetytywnych (ATAG)₄(ATAC)₁(ATAG)₂ locus GATA H4.2 (allel GATA H4.2*7). Sekwencje rozpoznawane przez startery używane w pracy Gusmão i wsp. [58], w oparciu o którą ISFG zaleca nazywanie loci i alleli GATA H4 [57], wyróżniono kolorem szarym; sekwencje rozpoznawane przez startery używane w niniejszej pracy wyróżniono kolorem żółtym.

5.2. OPTYMALIZACJA MULTIPLEKSU

Amplifikacja 18 loci Y-STR metodą kompleksowej reakcji PCR i analiza metodą elektroforezy kapilarnej przeprowadzona zgodnie z oryginalnie opisanym protokołem [35] wskazała na konieczność optymalizacji multipleksu. Sygnał fluorescencji o sile przewyższającej górną granicę detekcji i prowadzący do pojawiania się dodatkowych pików w panelach odpowiadających innym barwnikom (tzw. przecieków) obserwowano w przypadku systemów DYS426 i DYS460, podczas gdy stosunkowo niskie były piki odpowiadające produktom amplifikacji loci DYS19 i DYS392 (ryc. 5.).



Ryc. 5. Wynik amplifikacji oktadekapektu w oryginalnych warunkach. Gwiazdką (*) oznaczono przecieki fluorescencji pików odpowiadających produktom amplifikacji loci DYS426 i DYS460.

5.2.1. OCENA WPŁYWU OBJĘTOŚCI MIESZANINY REAKCYJNEJ

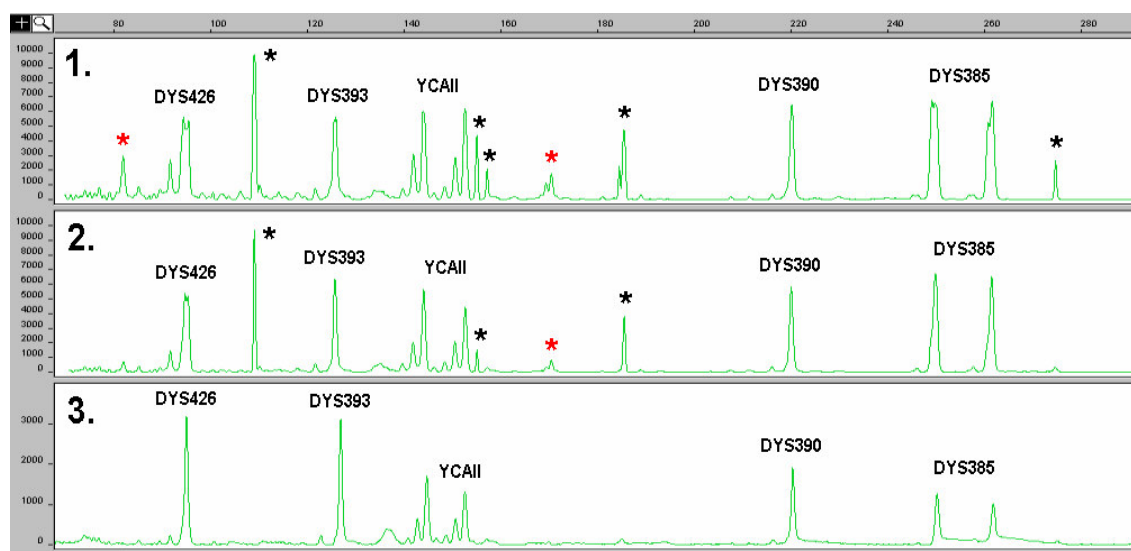
Amplifikację prowadzono początkowo w całkowitej objętości 20 μl , 10 μl , 5 μl , 2,5 μl i 1 μl . Wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej w każdej próbie były w jednakowych proporcjach, zaś na każde 5 μl mieszaniny przypadało 5 ng DNA. W całym zakresie objętości uzyskano zbliżony wynik reakcji PCR, jedynie w przypadku 1 μl nie stwierdzono jakiegokolwiek amplifikacji. W dalszych badaniach reakcję PCR prowadzono w 5 μl mieszaniny reakcyjnej.

5.2.2. OCENA WPŁYWU TEMPERATURY POKRYWY TERMOCYKLERA

Amplifikację prowadzono w termocyklerze o pokrywie ogrzanej do temperatury 105 $^{\circ}\text{C}$ lub 110 $^{\circ}\text{C}$. Wydajność amplifikacji przy 110 $^{\circ}\text{C}$ była wyraźnie wyższa (nawet 3-krotnie) w przypadku takich systemów jak DYS19, DYS392, DYS393, DYS438, DYS439, DYS460 i GATA H4.1. W przypadku pozostałych systemów wpływ był nieznaczny lub nie obserwowano go w ogóle. W dalszych badaniach reakcję PCR prowadzono pod pokrywą ogrzaną do 110 $^{\circ}\text{C}$.

5.2.3. OCENA WPŁYWU ILOŚCI DNA

Do reakcji PCR dodawano różną ilość matrycowego DNA: od 0,5 ng do 100 ng. Już przy 2,5 ng DNA obserwowano ścięte, często rozdwojone piki wynikające ze zbyt silnej fluorescencji, przecieki i produkty niespecyficzne o liczbie i sile rosnącej wraz z ilością matrycowego DNA obecnego w czasie reakcji. Problemów tych nie obserwowano w przypadku 0,5 ng i 1 ng DNA, jednakże wysokość pików była silnie zróżnicowana, wskazując na konieczność optymalizacji stężeń starterów (ryc. 6.). Szczególnie wyraźne było to w przypadku systemu DYS460.

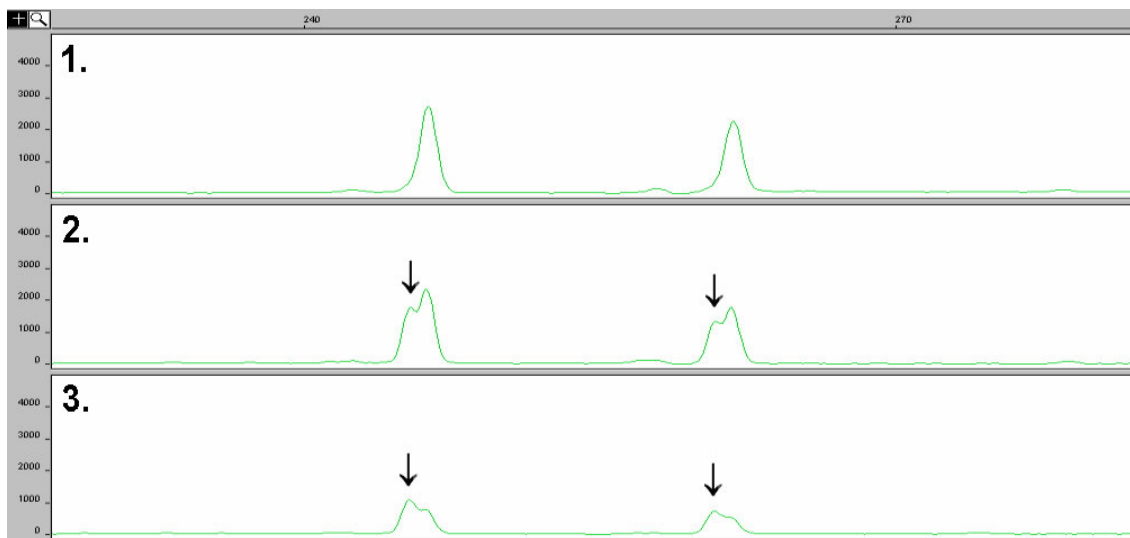


Ryc. 6. Wpływ różnej ilości matrycowego DNA na obraz amplifikacji oktadekapektu na przykładzie loci z zielonego panelu. 1–3: 100 ng DNA; 10 ng DNA; 1 ng DNA. Czarną gwiazdką (*) oznaczono przecieki fluorescencji pików z innych paneli; czerwoną gwiazdką (*) oznaczono produkty niespecyficzne.

5.2.4. OCENA WPŁYWU ILOŚCI POLIMERAZY DNA

Do amplifikacji dodawano różne ilości polimerazy DNA AmpliTaq Gold (0,5 jednostki, 0,4 jednostki i 0,3 jednostki) oraz 5 ng lub 2 ng genomowego DNA mężczyzny.

W przypadku 5 ng DNA nie stwierdzono jakiegokolwiek wpływu ilości polimerazy na obecność przecieków. Reakcja PCR w obecności 0,3 jednostki polimerazy DNA pozwalała na amplifikację wszystkich systemów, wyraźnie jednak malała wydajność amplifikacji największych fragmentów, zaś w przypadku systemu DYS385 zaczynał dominować produkt nieadenylowany, krótszy od właściwego produktu o jeden nukleotyd (ryc. 7.).



Ryc. 7. Wpływ ilości polimerazy DNA AmpliTaq Gold na amplifikację systemu DYS385 w obecności 5 ng genomowego DNA mężczyzny. Strzałki (↓) wskazują produkt nieadenylowany.

1–3: 0,5 jednostki; 0,4 jednostki; 0,3 jednostki.

Natomiast w przypadku stosowania 2 ng DNA obserwowano przecieki fluorescencji pików DYS460 oraz w mniejszym stopniu DYS426 i DYS393. Przy 0,3 jednostki polimerazy wyraźnie malała wydajność amplifikacji nawet najmniejszych fragmentów, zaś w przypadku największych systemów zanikał sygnał amplifikacji. Ponadto niekiedy nie obserwowano przecieków fluorescencji pików odpowiadającego produktowi amplifikacji locus DYS460, jednakże pik ten zawsze był relatywnie wyższy w porównaniu do pików innych systemów.

5.2.5. OPTIMALIZACJA STĘŻEŃ STARTERÓW

Z uwagi na fakt, że wysokość pików poszczególnych systemów zależała od ilości matrycowego DNA dodanego do amplifikacji, optymalizację stężeń starterów prowadzono dla 5 ng genomowego DNA. Początkowo stężenie starterów danego systemu zmniejszono lub zwiększono proporcjonalnie do wysokości pików na elektroforogramie tak, aby piki o wyróżniającej się sile sygnału osiągnęły wysokość zbliżoną do średniej dla wszystkich systemów. W późniejszym etapie mniejsze różnice w sygnale fluorescencji między poszczególnymi systemami eliminowano empirycznie. W przypadku locus DYS460 konieczne było nawet 7-krotne obniżenie stężenia starterów. Dodatkowo przeprowadzono również optymalizację stężeń starterów dla 0,2 ng genomowego DNA, dodając do amplifikacji 2 μ l DNA o stężeniu 0,1 ng/ μ l. Optymalne stężenia starterów, pozwalające na

uzyskanie produktów amplifikacji o porównywalnym sygnale fluorescencji, przedstawiono w tabeli I.

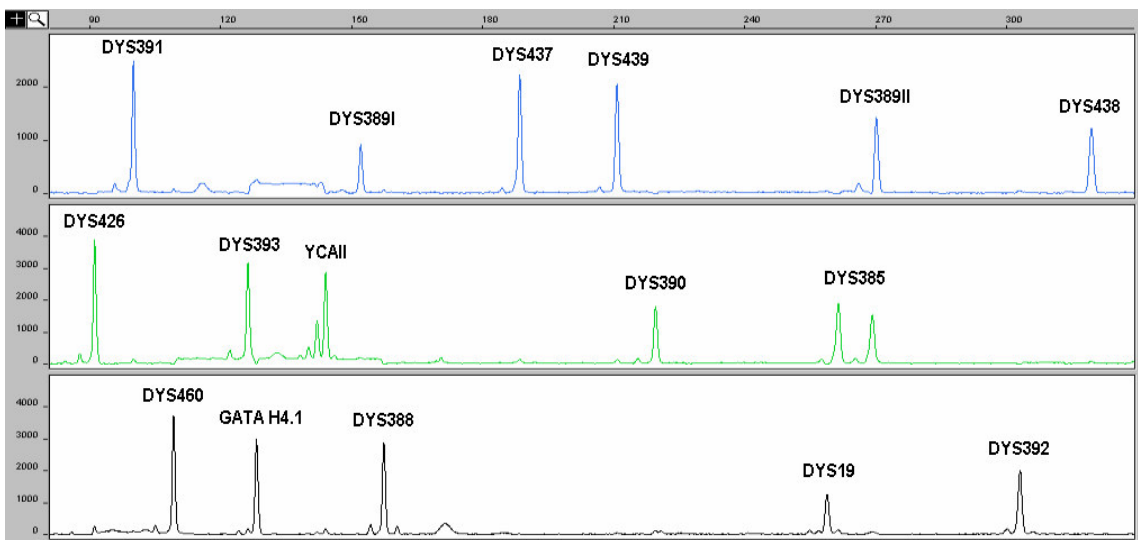
Tab. I. Porównanie oryginalnych [35] i zoptymalizowanych stężeń starterów w oktadekapleksie. Wyfuszczono stężenia zmodyfikowane w porównaniu do oryginalnych.

	stężenia oryginalne (5–10 ng DNA) [μ M]	stężenia zoptymalizowane dla 5 ng DNA [μ M]	stężenia zoptymalizowane dla 0,2 ng DNA [μ M]
DYS19	1,8	1,8	1,8
DYS385	0,6	0,6	0,5
DYS388	1,8	1,5	1,5
DYS389	1,3	1,3	1,2
DYS390	0,2	0,2	0,2
DYS391	0,2	0,2	0,2
DYS392	1,8	1,8	1,8
DYS393	0,4	0,15	0,15
DYS426	0,2	0,1	0,2
DYS437	0,2	0,1	0,2
DYS438	0,2	0,4	0,4
DYS439	0,2	0,2	0,2
DYS460	0,7	0,1	0,1
GATA H4.1	0,4	0,4	0,25
YCAII	0,9	0,9	0,9

5.2.6. OPTIMALIZACJA NASTRZYKU ELEKTROKINETYCZNEGO

Jako że amplifikacja w obecności 5 ng DNA przy analizie wielu próbek prowadziła niekiedy do powstawania niewielkich przecieków pojedynczych systemów, optymalizacji poddano nastrzyk elektrokinetyczny.

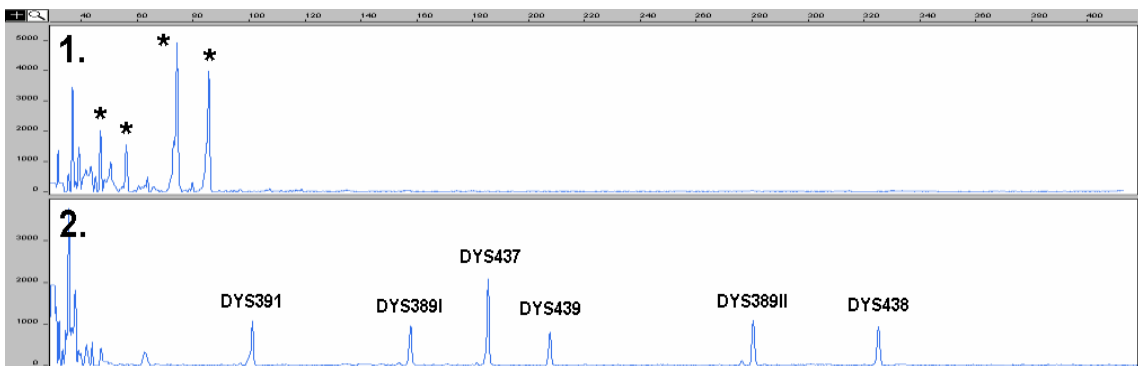
W pierwszym etapie zbadano wpływ na wysokość pików ilości amplifikatu poddawanego denaturacji, a tym samym stężenia produktów PCR w nastrzykiwanej próbce. W tym celu do jednakowej objętości dejonizowanego formamidu zmieszanego z wewnętrznym standardem wielkości dodawano 0,5 μ l i 0,25 μ l amplifikatu i po denaturacji i elektroforezie porównywano wysokości pików na elektroforogramach. Stosunek wysokości pików przy 0,25 μ l amplifikatu do wysokości pików przy 0,5 μ l amplifikatu dla 33 porównywanych pików wyniósł średnio $0,81 \pm 0,06$. Jako że obniżenie wysokości pików było zbyt małe, pomocne okazało się skrócenie czasu nastrzyku z 10 s do 5 s, które praktycznie usunęło sporadycznie pojawiające się piki o sile sygnału fluorescencji przekraczającej górną granicę detekcji. W przypadku amplifikacji w obecności 0,2 ng DNA optymalnym okazał się 5-sekundowy nastrzyk przy 15 kV. Przykładowy elektroforogram po optymalizacji przedstawia ryc. 8.



Ryc. 8. Typowy elektroforogram oktadekapeksu po amplifikacji w obecności 5 ng DNA w zoptymalizowanych warunkach.

5.2.7. OCENA WPŁYWU RODZAJU POLIMERAZY DNA UŻYTEJ DO AMPLIFIKACJI

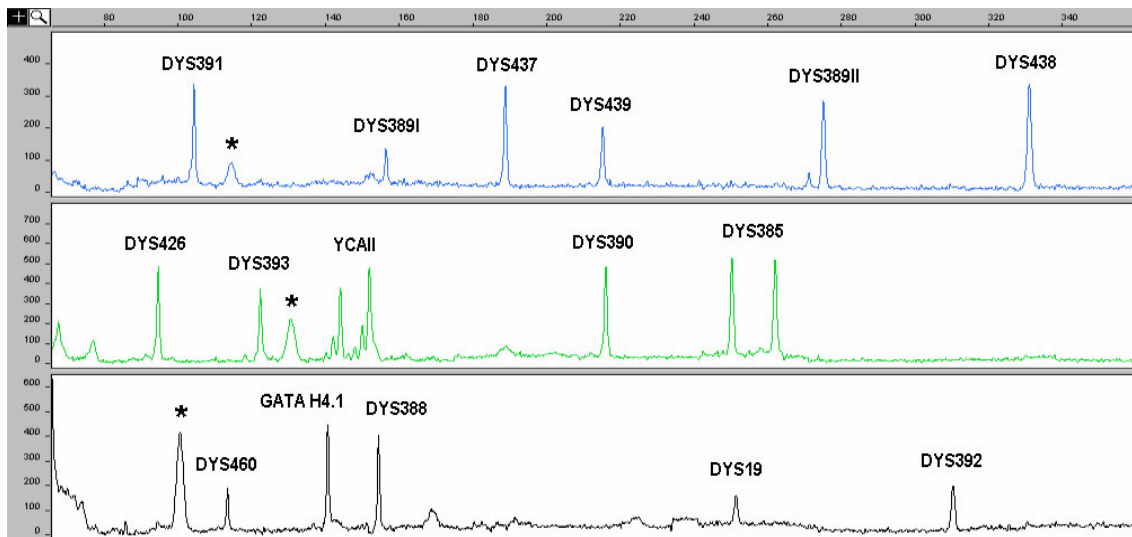
Do amplifikacji w identycznych warunkach użyto polimerazy *Taq* (Promega) i polimerazy AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) wraz z odpowiednim dla danego enzymu buforem do reakcji PCR, po czym produkty reakcji poddano elektroforezie i analizie w standardowych warunkach. Pełny profil uzyskiwano jedynie przy użyciu polimerazy AmpliTaq Gold. W przypadku polimerazy *Taq* nie dochodziło w ogóle do amplifikacji prawidłowych produktów reakcji PCR, pojawiały się natomiast bardzo krótkie, nieprzekraczające 100 bp produkty niespecyficzne (ryc. 9.).



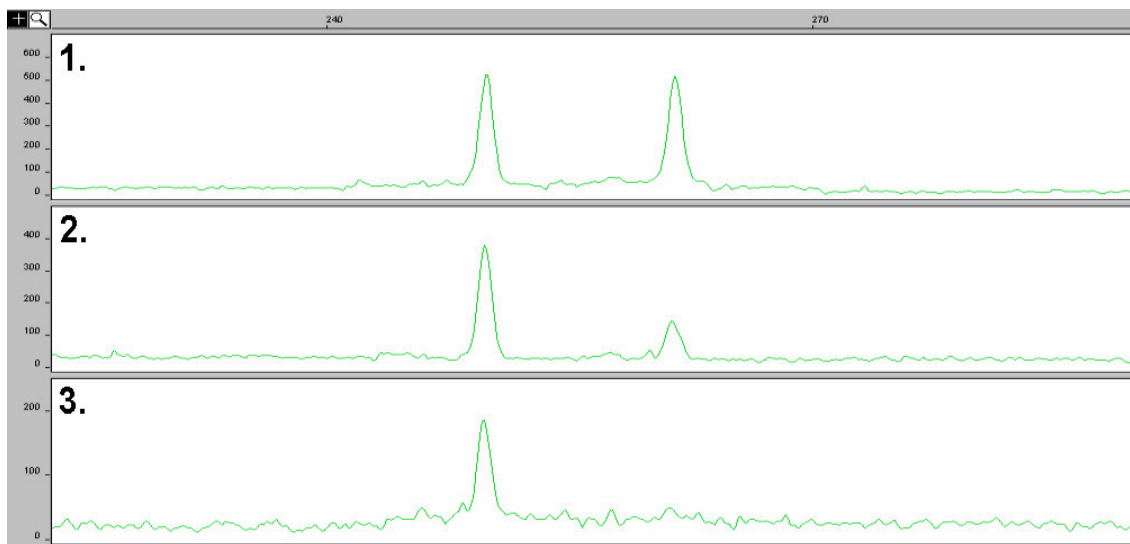
Ryc. 9. Obraz amplifikacji oktadekapeksu przy użyciu zwykłej polimerazy *Taq* (1) i polimerazy AmpliTaq Gold (2) na przykładzie loci z niebieskiego panelu. Gwiazdką (*) oznaczono produkty niespecyficzne.

5.2.8. BADANIE CZUŁOŚCI MULTIPLEKSU

W badaniu czułości oktadekapsu stosowano kontrolny DNA AmpFISTR 007 (Applied Biosystems) o znanym stężeniu równym 0,10 ng/μl. Do amplifikacji dodawano 25 pg, 50 pg, 100 pg i 250 pg DNA. Pełny profil uzyskiwano przy 250 pg i 100 pg genomowego DNA mężczyzny (ryc. 10.), przy czym wysokość pików, a tym samym wydajność amplifikacji, obniżała się wraz z malejącą ilością matrycowego DNA dodawanego do reakcji. Wiązało się to również z uwidacznianiem się kleksów, które przy niskim sygnale amplifikacji były relatywnie wysokie. Przy 50 pg i 25 pg DNA nie notowano amplifikacji pojedynczych systemów. Ponadto przy 25 pg DNA obserwowano zjawisko wypadania alleli w dwulokusowych systemach DYS385 i YCAII (ryc. 11.).



Ryc. 10. Obraz amplifikacji oktadekapsu w obecności 100 pg kontrolnego DNA AmpFISTR 007 (Applied Biosystems). Gwiazdką (*) oznaczono piki odpowiadające wolnym barwnikom fluorescencyjnym towarzyszącym nieoczyszczonym starterom (tzw. kleksy).



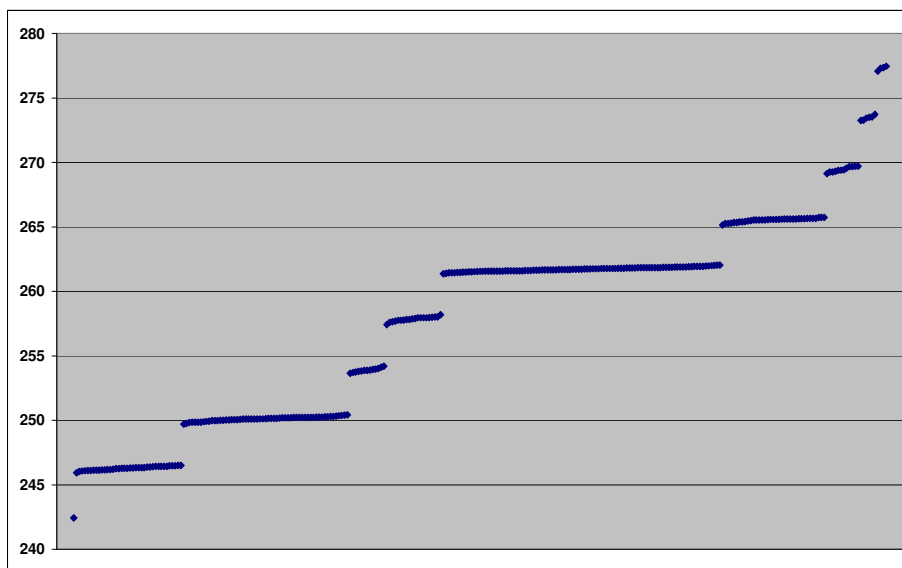
Ryc. 11. Wpływ ilości DNA dodanego do reakcji PCR na amplifikację systemu DYS385.

1–3: 100 pg DNA; 50 pg DNA; 25 pg DNA.

5.3. KONSTRUKCJA DRABINY ALLELI

5.3.1. OSZACOWANIE LICZBY ALLELI SYSTEMÓW Y-STR

Graficzne porównanie wielkości alleli odczytanych przy użyciu programu GeneScan 3.7 w poszczególnych systemach Y-STR dla 208 niespokrewnionych mężczyzn z populacji polskiej wykazało obecność 85 różnych alleli, przy czym liczba zidentyfikowanych w każdym systemie alleli była zróżnicowana i wynosiła od trzech (DYS426 i DYS437) do dziesięciu (DYS385, ryc. 12.). Po odliczeniu 14 alleli systemów DYS390, DYS932 i DYS393, które oznaczono elektroforetycznie na żelach poliakrylamidowych [129], 4 alleli DYS389I strukturalnie stanowiących część alleli DYS389II oraz 12 znanych alleli w innych systemach dla 4 próbek DNA, przysłanych w ramach testu kontroli jakości przez Instytut Medycyny Sądowej w Berlinie, ustalenia liczby jednostek repetytywnych wymagało 55 alleli, które poddano sekwencjonowaniu.



Ryc. 12. Wykres przedstawiający wielkości alleli DYS385, odczytane przy użyciu programu GeneScan 3.7 (Applied Biosystems) dla 208 niespokrewnionych mężczyzn z populacji polskiej i ułożone w kolejności rosnącej. Punkty odpowiadające poszczególnym wielkościom przy dużym zagęszczeniu łączą się w linie ciągłe odpowiadające 10 zidentyfikowanym allelom DYS385, których długość jest proporcjonalna do częstości występowania danego allelu.

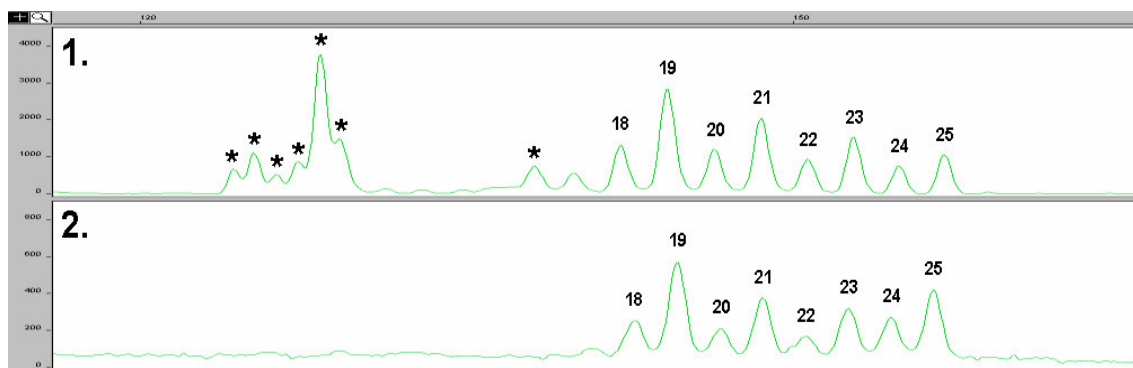
5.3.2. OPTIMALIZACJA WARUNKÓW SEKWENCJONOWANIA

Na przykładzie produktów sekwencjonowania alleli DYS391 porównano metodę precypitacji izopropanolem oraz 59% i 66% etanolem w obecności octanu sodu. W przypadku metody z użyciem izopropanolu obserwowano silny sygnał nieusuniętych terminatorów, które praktycznie uniemożliwiały odczyt sekwencji w jej początkowej części. Wytrącanie produktów reakcji wydłużania startera 59% etanolem usuwało wszelkie ślady terminatorów, jednak prowadziło również do utraty najkrótszych produktów sekwencjonowania oznaczanego allelu. Pełną sekwencję wraz z najkrótszymi fragmentami oraz brak lub śladowy sygnał terminatorów stwierdzono natomiast w przypadku precypitacji w obecności 66% etanolu.

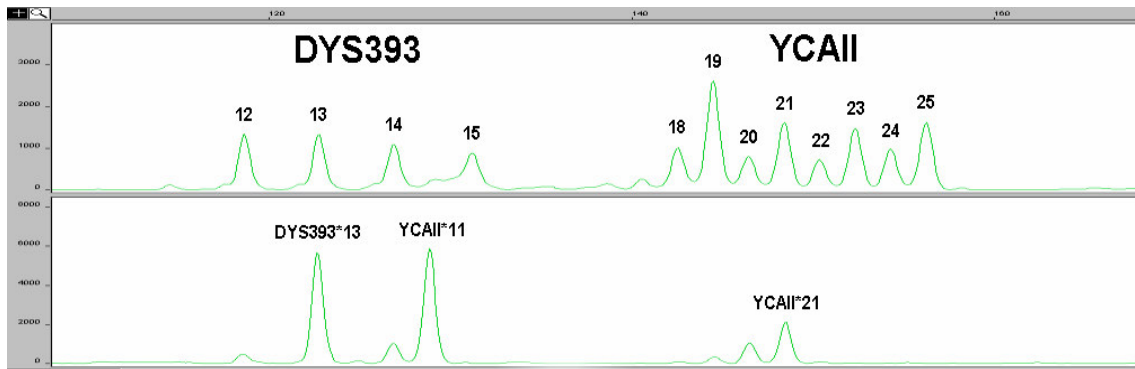
Pierwotnie elektroforezę kapilarną produktów reakcji wydłużania startera prowadzono w polimerze POP-4 [10], co umożliwiało jednoczesne genotypowanie i sekwencjonowanie bez konieczności zmiany polimeru. Mimo przetestowania szeregu parametrów dostępnych w programie Sequencing Analysis 3.7 nie udało się uzyskać zadowalającego rozdziału pików odpowiadających poszczególnym nukleotydom, szczególnie na początku sekwencji. Wymiana polimeru na POP-6 zdecydowanie poprawiła jej czytelność.

artefakty o wielkości i sile fluorescencji mogącej utrudniać oznaczanie alleli w sąsiedniej drabinie DYS393. W przypadku osobnej reakcji PCR dla każdej próbki DNA artefakty te były względnie niskie w stosunku do prawidłowych alleli i dopiero połączenie poszczególnych produktów amplifikacji w drabinie prowadziło do kumulacji produktów niespecyficznych. Do amplifikacji tychże artefaktów dochodziło nawet po oczyszczeniu drabiny jak i poszczególnych alleli metodą elektroforezy poliakrylamidowej i elucji z żelu. Nie zauważono również zależności stosunku wysokości artefaktów do wysokości właściwego produktu zarówno od temperatury hybrydizacji starterów w zakresie 52–58 °C, jak i od liczby cykli amplifikacji w zakresie 20–32.

Korelację taką zaobserwowano dopiero w przypadku różnych ilości genomowego DNA dodanych do amplifikacji. Wraz z malejącą ilością DNA obniżał się sygnał amplifikacji alleli YCAII, przy czym zmniejszał się również stosunek artefaktów do właściwych alleli. Przy 0,5 ng DNA artefaktów nie obserwowano i produkty amplifikacji alleli przy tej ilości matrycy posłużyły do stworzenia drabiny YCAII (ryc. 15.). Z uwagi na fakt, że bardzo rzadki allel YCAII*11 zaobserwowany w badanej populacji, krótszy aż o 7 jednostek repetytywnych od kolejnego zidentyfikowanego allelu w tym systemie [130], znajdował się w zakresie wielkości alleli DYS393, allelu tego nie włączono do drabiny (ryc. 16.).



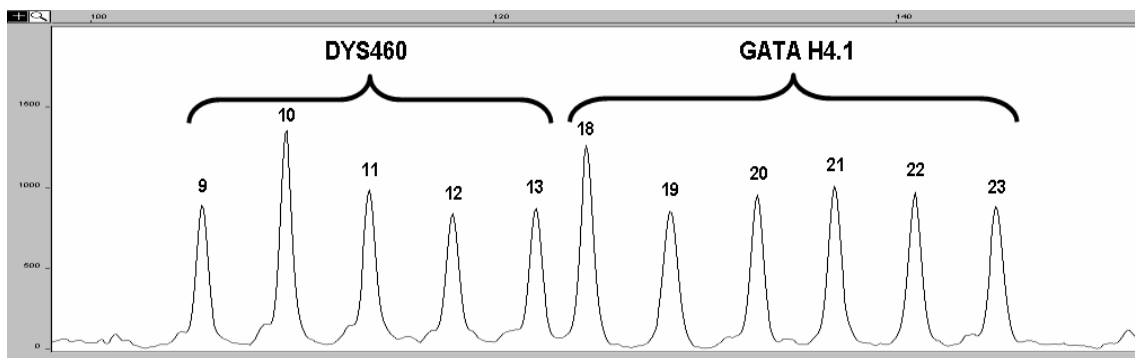
Ryc. 15. Drabina YCAII przed optymalizacją (1) i po optymalizacji (2). Allele YCAII o numerach parzystych stanowią produkty typu *stutter* towarzyszące amplifikacji następujących po nich alleli o numerach nieparzystych. Gwiazdką (*) oznaczono produkty niespecyficzne, do kumulacji których dochodzi przy składaniu drabiny w standardowych warunkach.



Ryc. 16. Porównanie wyniku amplifikacji DNA o genotypie $DYS393^*13$, $YCAII^*11,21$ z połączonymi drabinami alleli dla systemów $DYS393$ i $YCAII$.

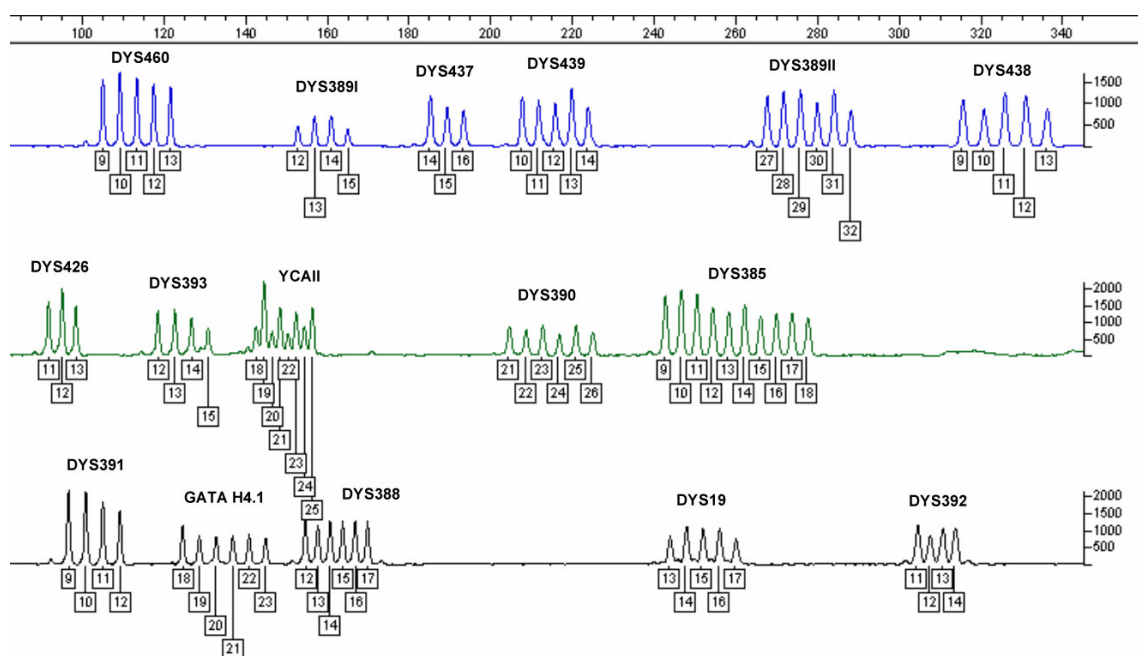
5.3.5. TWORZENIE DRABINY ALLELI DLA MULTIPLEKSU

Uzyskane średnie wysokości pików w poszczególnych drabinach loci Y-STR po 5-sekundowym nastrzyku przy 3 kV i 0,3 kV w przypadku drabin o intensywnym sygnale fluorescencji posłużyły do obliczenia stosunku poszczególnych drabin w ostatecznej drabinie dla pełnego oktadekapleksu. Na skutek zmieszania drabin doszło do ich rozcieńczenia i osłabienia sygnału fluorescencji, jednak zwiększenie napięcia przy nastrzyku elektrokinetycznym do 15 kV zrekompensowało wspomniane straty w wysokości pików. Dodatkowe wydłużenie czasu nastrzyku z 5 s do 10 s nie miało już wpływu na czytelność drabiny, prowadziło jedynie do poszerzenia pików większych systemów i pogorszenia rozdzielczości. Połączenie poszczególnych drabin w jedną drabinę dla całego multipleksu wykazało jednak niebezpiecznie mały odstęp między systemami $DYS460$ i $GATA H4.1$, który w przypadku identyfikacji większych alleli $DYS460$ i mniejszych alleli $GATA H4.1$ mogło utrudniać interpretację wyniku (ryc. 17.).



Ryc. 17. Połączone drabiny systemów $DYS460$ i $GATA H4.1$.

Porównanie zakresów wielkości drabin w poszczególnych panelach wykazało, że zastąpienie systemu DYS460 w żółtym panelu systemem DYS391 z niebieskiego panelu z jednoczesnym przeniesieniem systemu DYS460 do panelu niebieskiego znacznie poszerzy odstęp między drabinami i nie spowoduje pokrywania się zakresów wielkości drabin w obu panelach. Dlatego w dalszych badaniach stosowano starter *forward* DYS391 znakowany barwnikiem HEX oraz starter *forward* DYS460 znakowany barwnikiem 6-FAM. Tak stworzoną drabinę alleli Y-STR dla badanego oktadekpleksu wykorzystano w dalszej części pracy do genotypowania alleli w badanym DNA. Ostateczny obraz drabiny po optymalizacji przedstawia ryc. 18.



Ryc. 18. Drabina Y-STR dla badanego oktadekpleksu o zoptymalizowanym sygnale fluorescencji alleli.

5.4. KONTROLA JAKOŚCI

Porównanie wyników genotypowania 3 loci Y-STR dla 35 próbek DNA izolowanego z materiału biologicznego pobranego od niespokrewnionych mężczyzn z populacji polskiej z użyciem tripleksu rozdzielanego w natywnych żelach poliakrylamidowych [129] z wynikami uzyskanymi dla badanego oktadekpleksu wykazało pełną zgodność między obiema metodami detekcji. Poprawność oznaczania alleli w zakresie loci wchodzących w skład haplotypów rozszerzonych została również zweryfikowana pozytywnie ocenionym

testem kontroli jakości genotypowania markerów Y-STR dla 4 próbek DNA o nieznanym genotypach, organizowanym przez Instytut Medycyny Sądowej w Berlinie.

5.5. CHARAKTERYSTYKA NIETYPOWYCH ALLELI Y-STR

W toku badań populacyjnych stwierdzono obecność u dwóch niespokrewnionych mężczyzn pośredniego allelu w systemie DYS392 oraz pojedynczy przypadek cichego allelu DYS19. Ponadto w sprawie o ustalenie pokrewieństwa zaobserwowano pośredni allel DYS385.

W przypadku mikrowariantów konieczne było poznanie ich struktury w celu nazwania tych alleli zgodnie z zaleceniami ISFG [57]. W przypadku cichego allelu DYS19 zbadano natomiast, czy brak amplifikacji tego systemu wynika z mutacji bądź polimorfizmu w miejscu przyłączenia startera czy też z delecji całego locus.

5.5.1. CHARAKTERYSTYKA ALLELI POŚREDNICH DYS385 I DYS392

Porównanie wielkości alleli pośrednich z drabiną alleli wykazało, że badany mikrowariant DYS385 leży w równej odległości od alleli DYS385*10 i DYS385*11, sugerując delecję lub insercję dwóch par zasad. Sekwencjonowanie badanego allelu wykazało następujący motyw: (AAGG)₆(GAAA)₂GA(GAAA)₈, wskazując na obecność 10 jednostek repetytywnych GAAA rozdzielonych 2-nukleotydową wstawką GA. Zgodnie z zaleceniami ISFG allel ten nazwano DYS385*10.2.

Pod względem wielkości odczytanej przy użyciu programu komputerowego GeneScan 3.7 badany mikrowariant DYS392 był krótszy od allelu DYS392*11 o 1 nukleotyd, sugerując delecję 1 pary zasad w tymże allelu lub insercję 2 par zasad w allelu DYS392*10. Porównanie sekwencji allelu pośredniego DYS392 z sekwencją allelu oznaczonego jako DYS392*11 nie wykazało jednak jakiegokolwiek różnicy pod względem liczby par zasad między porównywanymi allelami. Wykazano jedynie transwersję cytozyny do guaniny w regionie flankującym sekwencję repetytywną po stronie 5' (ryc. 19.). Zgodnie z zaleceniami ISFG allel ten nazwano DYS392*11 (U180C→G). W dalszej części pracy stosowano również krótszą nazwę DYS392*11A, oznaczającą allel przesunięty w stosunku do allelu o regularnej liczbie powtórzeń w kierunku anody [16].

Próbki DNA, w których wykazano allel DYS392*11 (U180C→G), poddano również analizie z użyciem komercyjnych zestawów: Y-PLEX 12 (Reliagene Technologies),

PowerPlex Y (Promega) oraz Yfiler (Applied Biosystems). Zarówno PowerPlex Y, jak Yfiler wskazały na obecność allelu krótszego od allelu DYS392*11 o 1 nukleotyd. Natomiast w przypadku zestawu Y-PLEX 12 nie stwierdzono jakiegokolwiek przesunięcia w stosunku do drabiny i allel ten oznaczany był jako DYS392*11.

```

Y392*11      TAGAGGCAGTCATCGCAGTGGCCCAAGTGATCTTGCAACATCTCCATCCATGTTGCTCCA
S029         TAGAGGCAGTCATCGCAGTGGCCCAAGTGATCTTGCAACATCTCCATCCATGTTGCTCCA
*****

Y392*11      AAGGACCCAATTTTACTGTAAATGGTTGTATAGTATTTTATGGTCTACATAGACCATATT
S029         AAGGAGCCAATTTTACTGTAAATGGTTGTATAGTATTTTATGGTCTACATAGACCATATT
*****

Y392*11      TACCATATGTTTCATCCATATTTTCTTCATTAATCTAGCTTTTAAAAACAACATAATTGAT
S029         TACCATATGTTTCATCCATATTTTCTTCATTAATCTAGCTTTTAAAAACAACATAATTGAT
*****

Y392*11      TTCAAGTGTGTTGTTATTTAAAGCCAAGAAGGAAAACAAATTTTTTCTGTATCACCAT
S029         TTCAAGTGTGTTGTTATTTAAAGCCAAGAAGGAAAACAAATTTTTTCTGTATCACCAT
*****

Y392*11      TTATTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTACTAAGGAATGGGATTGGTA
S029         TTATTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTACTAAGGAATGGGATTGGTA
*****

Y392*11      GGT
S029         GGT
*****

```

Ryc. 19. Porównanie sekwencji allelu DYS392*11 i allelu DYS392*11 (U180C→G) przy użyciu programu ClustalX 1.81. Podkreślono motyw jednostek repetytywnych (TAT)₁₁. Kolorem szarym wyróżniono sekwencje rozpoznawane przez używane w pracy startery; kolorem żółtym wyróżniono miejsce mutacji punktowej.

5.5.2. CHARAKTERYSTYKA CICHEGO ALLELU DYS19

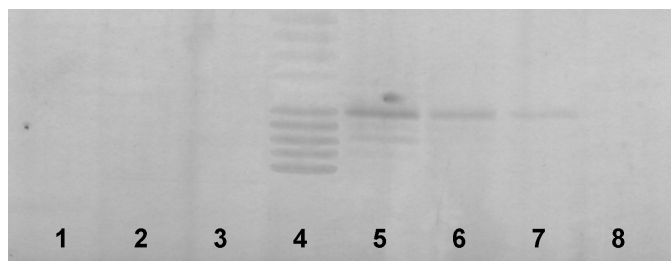
W celu zbadania przyczyny braku amplifikacji locus DYS19 w jednej z badanych próbek DNA konieczne było zastosowanie pary starterów o sekwencjach niepokrywających się z sekwencjami starterów wykorzystywanych w oktadekaplesie. Porównanie miejsc przyłączania się starterów DYS19 opisywanych w piśmiennictwie [34] wykazało, że kryteria takie spełniają startery z dwóch różnych par, oznaczone w cytowanej pracy jako «Wiegand and Kleiber F» oraz «1R'», które rozpoznają sekwencje położone wewnątrz w stosunku do sekwencji komplementarnych do starterów stosowanych w badanym multipleksie.

Jako że przydatności starterów takiej pary do amplifikacji systemu DYS19 dotychczas nie opisywano, konieczne było sprawdzenie ich kompatybilności. Analiza potencjalnych oddziaływań między starterami przy użyciu programu Vector NTI 3.1 wykluczyła tworzenie dimerów w trakcie reakcji PCR. Również przeszukanie sekwencji ludzkich zdeponowanych

w bazie danych NCBI z użyciem programu BLAST 2.2.12 potwierdziło specyficzność badanej pary starterów w stosunku do locus DYS19 na chromosomie Y.

Amplifikacja locus DYS19 w warunkach identycznych jak dla tripleksu obejmującego systemy DYS390, DYS392 i DYS393 [129] i analiza na 7,0% natywnych żelach poliakrylamidowych wykazała obecność we właściwym zakresie wielkości pojedynczego prążka pozbawionego produktów niespecyficznych, wykluczając konieczność dodatkowej optymalizacji. Amplifikacja DNA kontrolnego o znanym genotypie w locus DYS19 w ilości 5 ng, 10 ng i 20 ng wykazała obecność pojedynczego prążka o sile rosnącej wraz z ilością DNA. Natomiast w przypadku DNA o cichym allelu DYS19 nie stwierdzono jakiegokolwiek amplifikacji w zakresie wielkości alleli DYS19 (ryc. 20.). Jedynie przy 10 ng i 20 ng DNA obserwowano obecność słabych produktów niespecyficznych o rozmiarze znacznie przekraczającym wielkość prawidłowego produktu, których nie obserwowano w przypadku DNA kontrolnego, potwierdzając zajście reakcji.

Brak amplifikacji systemu DYS19 przy użyciu alternatywnej pary starterów świadczy o delecji locus DYS19 na chromosomie Y.



Ryc. 20. Amplifikacja próby o cichym allelu DYS19 przy użyciu alternatywnej pary starterów komplementarnych do sekwencji niepokrywających się z sekwencjami rozpoznawanymi przez startery używane w oktadekapleksie.

1–3: DNA o cichym allelu DYS19 (5 ng; 10 ng, 20 ng).

4: drabina alleli 13–17 systemu DYS19, eluowana z żelu poliakrylamidowego i reamplifikowana przy użyciu nowej pary starterów i liczbie cykli amplifikacji zwiększonej do 35.

5–7: DNA kontrolny o allelu DYS19*17 (20 ng, 10 ng, 5 ng).

8: kontrola ujemna amplifikacji bez DNA.

5.6. ANALIZA POLIMORFIZMU MIKROSATELITARNYCH MARKERÓW CHROMOSOMU Y

5.6.1. CZĘSTOŚCI ALLELI

Tabela II przedstawia rozkład częstości alleli badanych markerów mikrosatelitarnych chromosomu Y w populacjach 208 niespokrewnionych Polaków, 164 niespokrewnionych Słowaków i 196 niespokrewnionych Białorusinów.

Tab. II. Częstości alleli badanych loci Y-STR (układów alleli w przypadku systemów dwulokusowych) w populacjach: polskiej, słowackiej i białoruskiej.

system	allel (układ alleli)	populacja polska (n=208)	populacja słowacka (n=164)	populacja białoruska (n=196)	system	allel (układ alleli)	populacja polska (n=208)	populacja słowacka (n=164)	populacja białoruska (n=196)
DYS19	13	0,0433	0,0488	0,0510	GATA H4.1	17	–	–	0,0051
	14	0,1779	0,1890	0,1633		18	0,0048	–	–
	15	0,1875	0,2439	0,2755		19	0,0144	0,0122	0,0102
	16	0,3317	0,3842	0,4286		20	0,2692	0,3720	0,3214
	17	0,2596	0,1342	0,0765		21	0,6010	0,4573	0,4082
	del	–	–	0,0051		22	0,1058	0,1463	0,2449
DYS388	11	–	–	0,0102	DYS385	23	0,0048	0,0122	0,0102
	12	0,7596	0,7073	0,7092		9,14	0,0048	–	–
	13	0,1442	0,1951	0,1837		10,10	0,0096	–	–
	14	0,0625	0,0610	0,0612		10,11	0,0048	–	–
	15	0,0192	0,0183	0,0153		10,13	0,0048	0,0061	0,0153
	16	0,0096	0,0183	0,0153		10,14	0,1731	0,0976	0,0051
DYS389I	17	0,0048	–	0,0051		10,15	0,0240	0,0061	0,0102
	12	0,1490	0,1220	0,1276		10,17	0,0048	–	–
	13	0,7067	0,7317	0,7143		11,11	–	0,0122	0,0051
	14	0,1394	0,1463	0,1582		11,12	0,0048	–	–
DYS389II-I	15	0,0048	–	–		11,13	0,0625	0,0183	0,0867
	15	0,0144	0,0061	0,0204		11,14	0,2740	0,3720	0,3520
	16	0,3558	0,3476	0,3827		11,15	0,0625	0,0793	0,1480
	17	0,4664	0,4207	0,3725		11,16	0,0144	0,0061	0,0051
	18	0,1490	0,2073	0,1582		12,12	0,0048	–	–
DYS390	19	0,0144	0,0183	0,0663		12,13	0,0048	–	0,0051
	21	0,0096	–	–		12,14	0,0481	0,0122	0,0153
	22	0,0625	0,0854	0,0561		12,15	0,0144	0,0122	0,0153
	23	0,1298	0,1585	0,1684	12,16	0,0048	–	0,0051	
	24	0,2500	0,3232	0,3776	12,17	–	–	0,0051	
	25	0,5144	0,3902	0,3878	13,13	–	0,0061	0,0102	
DYS391	26	0,0337	0,0427	0,0102	13,14	0,0240	0,0183	0,0102	
	9	0,0096	–	0,0102	13,15	0,0144	0,0122	0,0306	
	10	0,6010	0,5244	0,4439	13,16	0,0048	–	0,0051	
	11	0,3702	0,4573	0,5306	13,17	0,0096	0,0122	0,0153	
DYS392	12	0,0192	0,0183	0,0153	13,18	–	0,0061	–	
	9	–	–	0,0051	14,14	0,0529	0,0549	0,0255	
	10	–	0,0061	0,0051	14,15	0,0914	0,1159	0,1327	
	11A	–	0,0122	–	14,16	0,0048	0,0244	0,0102	
	11	0,8173	0,7500	0,8010	14,17	0,0096	0,0122	–	
	12	0,0433	0,0366	0,0255	15,15	0,0096	0,0305	0,0153	
	13	0,0865	0,1585	0,0510	15,16	0,0096	0,0122	0,0051	
	14	0,0529	0,0366	0,1071	15,17	–	0,0122	0,0051	
	15	–	–	0,0051	15,18	–	0,0183	0,0102	

DYS393	11	–	0,0061	0,0051	DYS385 (kontynuacja)	16,16	–	0,0061	0,0051
	12	0,0577	0,0854	0,0612		16,17	0,0144	–	0,0051
	13	0,7981	0,7744	0,7959		16,18	0,0192	0,0183	0,0153
	14	0,1394	0,1281	0,1276		16,19	–	–	0,0051
	15	0,0048	0,0061	0,0102		16,21	–	0,0061	–
DYS426	10	–	0,0061	–		17,17	–	0,0122	–
	11	0,3654	0,3902	0,4541		17,18	0,0144	–	0,0051
	12	0,6298	0,6037	0,5459		17,19	–	–	0,0102
	13	0,0048	–	–		18,19	–	–	0,0051
DYS437	14	0,7019	0,5549	0,6786		YCAII	11,21	0,0048	–
	15	0,2115	0,3293	0,2245	18,19		–	0,0061	–
	16	0,0865	0,1098	0,0867	18,20		0,0433	0,0305	0,1071
	17	–	0,0061	0,0102	18,23		–	0,0061	–
DYS438	9	0,0144	0,0305	0,0306	19,19		0,0337	0,0183	0,0051
	10	0,3125	0,3476	0,4286	19,20		0,0144	0,0183	0,0255
	11	0,5577	0,4451	0,4643	19,21		0,1106	0,1159	0,1174
	12	0,1010	0,1646	0,0765	19,22		0,0385	0,0488	0,0204
	13	0,0144	0,0122	–	19,23		0,5817	0,5122	0,4898
DYS439	10	0,4423	0,2683	0,4235	19,24		0,0096	0,0183	0,0204
	11	0,2740	0,3598	0,2806	19,25		0,0048	–	–
	12	0,1923	0,2683	0,1735	20,20		0,0289	0,0366	–
	13	0,0865	0,0854	0,1122	20,21		–	0,0244	0,0408
	14	0,0048	0,0183	0,0051	20,22		0,0048	–	0,0051
	15	–	–	0,0051	20,23		0,0048	–	0,0051
DYS460	9	0,0289	0,0366	0,0408	21,21		0,0914	0,1342	0,1225
	10	0,2837	0,3049	0,2959	21,22		0,0144	0,0061	0,0204
	11	0,5914	0,5488	0,5612	21,23		0,0048	–	0,0051
	12	0,0914	0,1098	0,1020	22,22		0,0048	0,0183	–
	13	0,0048	–	–	22,23		–	–	0,0051
					23,23	0,0048	–	0,0102	
					23,24	–	0,0061	–	

W locus DYS19 stwierdzono obecność 6 alleli, w tym 1 allelu cichego spowodowanego delecją, przy czym najczęściej występował allel DYS19*16 (33,2% – 42,9%).

Spośród 7 zidentyfikowanych alleli w systemie DYS388 najczęściej występuje allel DYS388*12. We wszystkich porównywanych populacjach jego częstość przekracza 70%.

W loci DYS389I i DYS389II-I wykazano odpowiednio 4 i 5 alleli. W przypadku pierwszego systemu zdecydowanie dominował allel DYS389I*13 o częstości przewyższającej 70%, zaś w drugim locus najczęściej notowano allele DYS389II-I*16 (34,8% – 38,3%) i DYS389II-I*17 (37,3% – 46,6%). Ogólnie częściej notowano allel 17, jedynie w przypadku populacji białoruskiej nieznacznie wyższą częstość stwierdzono dla allelu 16.

W przypadku locus DYS390 stwierdzono obecność 6 różnych alleli. W populacji polskiej najczęstszy był allel DYS390*25, który wykazano u ponad połowy mężczyzn. Allel ten był również najczęstszy w populacjach słowackiej i białoruskiej, jednak jego częstość nie przekraczała 40%.

W systemie DYS391 spośród 4 zidentyfikowanych alleli zdecydowaną większość stanowiły allele DYS391*10 (44,4% – 60,1%) oraz DYS391*11 (37,0% – 53,1%), przy czym

pierwszy z alleli był najliczniejszy w populacjach: polskiej i słowackiej, zaś drugi dominował liczebnie w populacji białoruskiej.

W locus DYS392 wykazano 8 alleli DYS392, w tym 2 allele o 11 jednostkach powtórzonych i różnej ruchliwości elektroforetycznej, spowodowanej polimorfizmem typu SNP w regionie flankującym sekwencję repetytywną. We wszystkich porównywanych populacjach dominował allel DYS392*11, którego częstość wynosiła od 75,0% w populacji słowackiej do 81,7% w populacji polskiej.

W przypadku systemu DYS393 spośród 5 zidentyfikowanych alleli najliczniej obserwowano allel DYS393*13, który stanowił niecałe 80% oznaczonych alleli we wszystkich trzech populacjach.

Najczęstszymi spośród 4 wariantów locus DYS426 wykazanych w badanych populacjach były allele DYS426*11 (36,5% – 45,4%) oraz DYS426*12 (54,6% – 63,0%).

W przypadku markera DYS437 stwierdzono obecność 4 różnych alleli, przy czym zdecydowanie dominował allel DYS437*14, który stanowił od 55,5% oznaczonych alleli w populacji słowackiej do 70,2% oznaczonych alleli w populacji polskiej.

Pięć różnych alleli wykazano w locus DYS438, przy czym najczęściej notowano allel DYS438*11 (44,5% – 55,8%).

W locus DYS439 wykazano 6 różnych alleli, spośród których najczęstszymi były allele DYS439*10 w populacji polskiej (44,2%) i białoruskiej (42,4%) oraz DYS439*11 w populacji słowackiej (36,0%).

We wszystkich trzech populacjach ponad połowę spośród 5 zidentyfikowanych alleli DYS460 stanowił allel DYS460*11 (54,9% – 59,1%).

Ponad 60% alleli locus GATA H4.1 w populacji polskiej stanowił allel GATA H4.1*21. W pozostałych dwóch populacjach najczęstszy był również allel 21, jednak był on zdecydowanie rzadszy (40,8% – 45,7%). Łącznie zidentyfikowano 7 alleli tego systemu.

W systemie DYS385 wykazano 12 alleli tworzących 42 różne genotypy, spośród których najczęściej obserwowano układ DYS385*11,14 (27,4% – 37,2%). Natomiast w systemie YCAII stwierdzono obecność 9 różnych alleli i 22 różne haplotypy. Zdecydowanie najczęstszy był genotyp YCAII*19,23 (49,0% – 58,2%).

5.6.2. PARAMETRY OKREŚLAJĄCE PRZYDATNOŚĆ POSZCZEGÓLNYCH LOCI Y-STR W GENETYCE SĄDOWEJ

Najbardziej polimorficznym badanych markerem Y-STR w populacji białoruskiej był system DYS389 ($H = 0,837$), zaś w populacjach polskiej i słowackiej najwyższą wartość zróżnicowania genetycznego H zanotowano w przypadku systemu DYS385 (odpowiednio 0,875 i 0,830).

Najbardziej wartościowym systemem w rozróżnianiu podobnych haplotypów okazał się system DYS389, którego udział w zdolności multipleksu do dyskryminacji zawarł się w przedziale 4,5% – 9,4%. Natomiast loci DYS426 i DYS438 nie miały jakiegokolwiek wpływu na zdolność haplotypów do dyskryminacji we wszystkich trzech populacjach. Brak wpływu na wartość ZD zaobserwowano również w przypadku systemów DYS388 i DYS393 w populacji polskiej oraz w przypadku systemów DYS388 i DYS391 w populacji białoruskiej (tab. III).

Tab. III. Wartości zróżnicowania genetycznego i udziału w zdolności do dyskryminacji multipleksu dla badanych markerów Y-STR w populacjach: polskiej, słowackiej i białoruskiej.

	Zróżnicowanie genetyczne			Udział w zdolności do dyskryminacji		
	populacja polska (n = 208)	populacja słowacka (n = 164)	populacja białoruska (n = 196)	populacja polska (n = 208)	populacja słowacka (n = 164)	populacja białoruska (n = 196)
DYS19	0,758	0,741	0,709	5,73	1,29	2,73
DYS388	0,400	0,460	0,461	0	0,65	0
DYS389	0,799	0,806	0,837	9,38	4,52	8,74
DYS389I	0,461	0,431	0,451	2,60	1,94	3,28
DYS389II-I	0,636	0,663	0,689	5,73	1,94	4,92
DYS390	0,654	0,713	0,679	3,13	1,29	1,09
DYS391	0,504	0,519	0,524	1,56	1,94	0
DYS392	0,321	0,394	0,345	0,52	0,65	0,55
DYS393	0,342	0,379	0,348	0	0,65	0,55
DYS426	0,472	0,486	0,498	0	0	0
DYS437	0,457	0,575	0,484	0,52	1,29	0,55
DYS438	0,584	0,657	0,597	0	0	0
DYS439	0,688	0,723	0,703	5,73	2,58	2,19
DYS460	0,563	0,596	0,588	3,13	2,58	2,19
GATA H4.1	0,558	0,635	0,673	2,60	1,94	4,37
DYS385	0,875	0,830	0,829	6,77	3,23	4,92
YCAII	0,638	0,704	0,720	1,56	1,29	1,09

5.6.3. ANALIZA HAPLOTYPÓW

Wśród 568 niespokrewnionych mężczyzn z populacji polskiej, słowackiej i białoruskiej wykazano 500 różnych haplotypów, z których 458 wystąpiło tylko jeden raz. Wartość zróżnicowania genetycznego H wyniosła 0,9991, zaś najczęstszy haplotyp

obserwowano 11 razy (1,9%). Haplotypy chromosomu Y obejmujące 18 loci STR w porównywanych populacjach charakteryzowały się zbliżonymi wartościami zarówno zróżnicowania genetycznego, jak i parametrów zdolności do dyskryminacji (ZD) i odsetka pojedynczych haplotypów (OPH). Wartość H wahała się od 0,9982 w populacji polskiej do 0,9992 w populacji słowackiej i białoruskiej, podczas gdy wartości ZD w badanych populacjach wyniosły odpowiednio 92,3%, 94,5% i 93,4% (tab. IV).

Tab. IV. Porównanie wartości H, ZD i OPH w badanych populacjach, obliczonych w stosunku do haplotypu minimalnego i haplotypu obejmującego 18 badanych loci Y-STR.

	haplotyp minimalny (9 loci Y-STR)			18 loci Y-STR		
	H	ZD [%]	OPH [%]	H	ZD [%]	OPH [%]
populacja polska (n = 208)	0,9927	75,5	63,5	0,9982	92,3	88,0
populacja słowacka (n = 164)	0,9932	73,8	59,8	0,9992	94,5	90,2
populacja białoruska (n = 196)	0,9947	75,0	63,3	0,9992	93,4	88,3
łącznie (n = 568)	0,9947	64,1	51,2	0,9991	88,0	80,6

Porównanie badanych haplotypów pod względem wartości H, ZD i OPH z haplotypami minimalnymi wykazało, że rozszerzenie zakresu genotypowanych loci Y-STR o kolejne 9 markerów znacznie podnosi analizowane parametry. Na zbadanych 568 mężczyzn wartość zdolności do dyskryminacji rosła o 37,3%, zaś udział haplotypów obserwowanych tylko raz podniósł się aż o 57,4%.

5.6.4. WSPÓLNA BAZA DANYCH HAPLOTYPÓW Y-STR

Analiza wariancji molekularnej ujawniła istotne różnice pomiędzy populacjami ($F_{ST} = 0,0086$; $P = 0,0004$) i wykluczyła możliwość stworzenia jednej wspólnej bazy danych haplotypów Y-STR.

Do identyfikacji loci odpowiedzialnych za różnice między populacjami użyto testu chi-kwadrat oraz analizy wariancji molekularnej „locus-by-locus”. Na poziomie istotności 0,05 wyniki uzyskane obiema metodami okazały się w pełni zgodne (tab. V). Statystycznie istotnych różnic między porównywanymi populacjami nie zaobserwowano w 8 loci: DYS388, DYS389I, DYS389II-I, DYS393, DYS426, DYS460 i YCAII a/b.

Tab. V. Wartości P w analizie homogeniczności rozkładu alleli w oparciu o test chi-kwadrat i metodę AMOVA „locus-by-locus” dla populacji polskiej, słowackiej i białoruskiej. Wytłuszczono wartości $P < 0,05$.

system	test chi-kwadrat	AMOVA „locus-by-locus”
DYS19	0,0004	0,0012
DYS388	0,9183	0,5498
DYS389I	0,9358	0,9362
DYS389II-I	0,2677	0,2594
DYS390	0,0466	0,0116
DYS391	0,0068	0,0062
DYS392	0,0019	0,0251
DYS393	0,7901	0,9252
DYS426	0,1859	0,2037
DYS437	0,0395	0,0097
DYS438	0,0047	0,0237
DYS439	0,0130	0,0037
DYS460	0,9835	0,9367
GATA H4.1	0,0001	0,0003
DYS385	0,0000	0,0000
YCAII	0,3610	0,0858

Analiza haplotypów obejmujących markery wykazujące homogeniczność w obrębie trzech populacji wykazała, że całkowita wariancja molekularna wynikała z wariancji wewnątrzpopulacyjnej ($F_{ST} = -0,0003$; $P = 0,49$) i umożliwiła stworzenie wspólnej bazy danych haplotypów Y-STR o zróżnicowaniu genetycznym równym 0,9632 i zdolności do dyskryminacji równej 35,4%. W przypadku wspólnych baz danych dla par populacji liczba loci Y-STR rosła (do 13 loci w przypadku bazy danych słowacko-białoruskiej), zaś wartości H i ZD były wyższe.

Z uwagi na fakt, że analiza wariancji molekularnej wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy trzema subpopulacjami białoruskimi ($F_{ST} = 0,0099$; $P = 0,03$), konieczne okazało się stworzenie wspólnej bazy danych haplotypów Y-STR przy podziale na 5 populacji: Polaków, Słowaków oraz Białorusinów z Polesia, dorzecza Dźwiny i środkowej Białorusi. Analiza AMOVA „locus-by-locus” dla pięciu populacji dostarczyła podobnych wyników pod względem zakresu loci odpowiedzialnych za różnice międzypopulacyjne. Jedynym dodatkowym systemem, który wymagał wykluczenia przy tworzeniu wspólnej bazy danych haplotypów Y-STR, był marker YCAII. Rozkład haplotypów obejmujących 6 pozostałych mikrosatelitów był homogeniczny ($F_{ST} = 0,0026$; $P = 0,15$), jednakże eliminacja dwulokusowego systemu YCAII spowodowała dalsze obniżenie zróżnicowania genetycznego do 0,9511 i zdolności do dyskryminacji do 26,2%.

Analiza wartości F_{ST} dla par porównywanych populacji w stosunku do haplotypów obejmujących wszystkie 18 loci Y-STR wykazała, że heterogeniczność w obrębie populacji białoruskiej wynikała z różnic między północną a środkową Białorusią, zaś pozostałe

porównania w parach nie dostarczały wartości F_{ST} , które byłyby różne od zera istotnie w sensie statystycznym (tab. VI).

Porównanie w parach wszystkich pięciu populacji ujawniło, że najbardziej wyróżniały się populacje Polski i północnej Białorusi. Populacja polska okazała się odmienna od wszystkich badanych populacji ($P < 0,05$ w stosunku do Słowacji, $P < 0,01$ we wszystkich innych porównaniach), natomiast w przypadku populacji północnej Białorusi jedyną statystycznie nieistotną wartość F_{ST} uzyskano dla porównania z południową Białorusią. Natomiast populacje Słowacji, Polesia i środkowej Białorusi były genetycznie nierozróżnialne, co pozwoliło to na stworzenie wspólnej bazy danych haplotypów Y-STR dla wszystkich 18 loci ($F_{ST} = 0,0037$; $P = 0,11$), w której zróżnicowanie genetyczne osiągnęło wartość 0,9995, zaś zdolność do dyskryminacji była równa 94,1%.

Tab. VI. Wartości F_{ST} (poniżej przekątnej) i odpowiadające im wartości P (powyżej przekątnej) w analizie AMOVA dla par populacji w stosunku do haplotypów obejmujących 18 badanych loci Y-STR. Wytłuszczono wartości $P > 0,05$.

	Polska	Słowacja	południowa Białoruś	środkowa Białoruś	północna Białoruś
Polska	–	0,01119	0,00990	0,00129	0,00079
Słowacja	0,00755	–	0,10860	0,14197	0,00693
południowa Białoruś	0,01389	0,00480	–	0,13771	0,30938
środkowa Białoruś	0,02015	0,00393	0,00549	–	0,00733
północna Białoruś	0,02567	0,02032	0,00179	0,02451	–

5.6.5. PORÓWNANIE HAPLOTYPÓW Y-STR W POPULACJI POLSKIEJ, SŁOWACKIEJ I BIAŁORUSKIEJ Z DANymi DLA INNYCH POPULACJI

W niniejszej pracy badaniom poddano markery 18 loci chromosomu Y, jednakże dla większości porównywanych populacji dostępne były jedynie haplotypy minimalne (DYS19, DYS389I, DYS389II-I, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385 a/b), stąd w analizie filogenetycznej wykorzystano wyłącznie loci wchodzące w ich skład.

Porównanie haplotypów minimalnych z populacji polskiej, oznaczonych w niniejszej pracy, z danymi dla sześciu subpopulacji polskich z różnych regionów kraju z bazy danych YHRD potwierdziło ich homogeniczność (wartości P w analizie AMOVA zawarły się w przedziale 0,13–0,70). Stąd też w dalszych obliczeniach dotyczących haplotypów minimalnych połączono wszystkie próbki z populacji polskiej ($n = 1521$).

Wyniki analizy wariancji molekularnej (AMOVA) wykazały obecność 5 zbiorów populacji połączonych siecią nieistotnych statystycznie wartości F_{ST} ($P > 0,05$):

- Litwini i Łotysze;
- wszystkie populacje zachodnio- i wschodniosłowiańskie oraz Słoweńcy;
- Białorusini z Podlasia (północno-wschodnia Polska);
- Chorwaci i Bośniacy;
- Serbowie, Macedończycy i Bułgarzy.

Najwięcej nieistotnych statystycznie wartości F_{ST} w porównaniach dla par populacji uzyskano w przypadku mieszkańców Ukrainy i południowej Białoruś (odpowiednio 8 i 7 wartości F_{ST}).

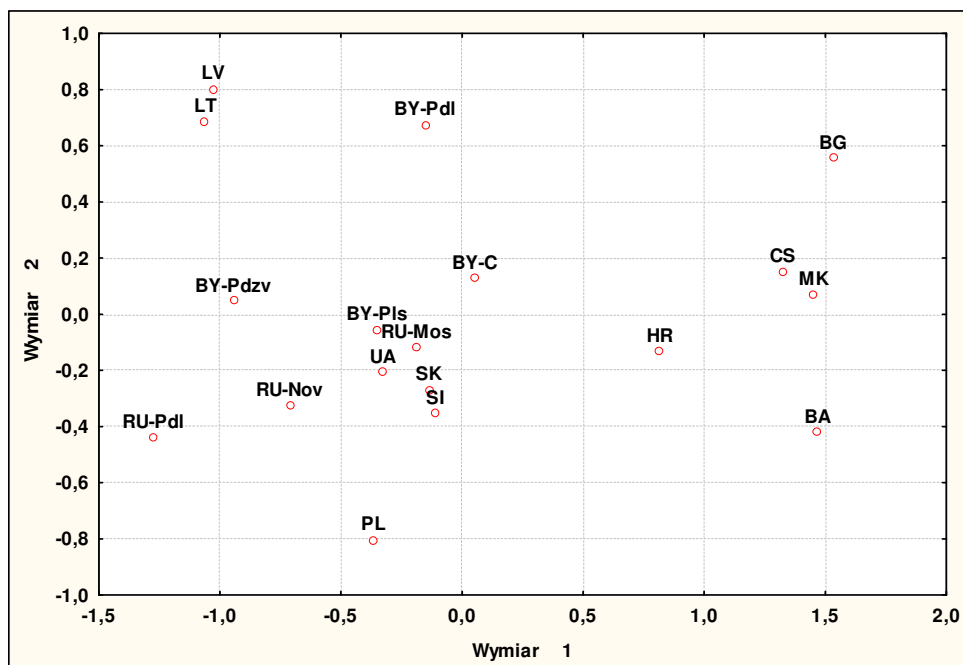
Na niższym poziomie istotności, równym 0,01, zanotowano jedynie 2 takie zbiory. Pierwszy obejmował wszystkie populacje zachodnio- i wschodniosłowiańskie, Słoweńców i Bałtów, zaś w drugim znalazły się wszystkie populacje południowosłowiańskie z wyjątkiem populacji słoweńskiej (tab. VII).

Na poziomie istotności 0,01 w przypadku populacji polskiej nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic jedynie w stosunku do populacji ukraińskiej i słowackiej. Populacja północnej Białorusi była jedyną populacją słowiańską, w stosunku do której analiza AMOVA nie wykazała statystycznie istotnych różnic względem niesłowiańskich populacji bałtyckich: litewskiej i łotewskiej.

Tab. VII. Wartości F_{ST} (poniżej przekątnej) i odpowiadające im wartości P (powyżej przekątnej) w analizie AMOVA dla par populacji w stosunku do haplotypów minimalnych. Wytluszczono wartości $P > 0,05$.

	PL	SK	BY Pdzv	BY C	BY Pls	BY Pdl	RU Pdl	RU Nov	RU Mos	UA	SI	HR	BA	CS	MK	BG	LT	LV
PL	–	0,0190	0,0000	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0048	0,0037	0,0542	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
SK	0,0032	–	0,0034	0,0898	0,1242	0,0001	0,0000	0,0546	0,5112	0,8896	0,6988	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
BY Pdzv	0,0326	0,0185	–	0,0074	0,2953	0,0000	0,0058	0,2640	0,0370	0,2320	0,0014	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0144	0,0131
BY C	0,0176	0,0050	0,0220	–	0,1581	0,0293	0,0000	0,0389	0,3510	0,1619	0,1939	0,0052	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004	0,0002
BY Pls	0,0188	0,0044	0,0024	0,0049	–	0,0012	0,0039	0,3973	0,3985	0,7322	0,0518	0,0024	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0018	0,0006
BY Pdl	0,0266	0,0144	0,0300	0,0082	0,0181	–	0,0000	0,0005	0,0007	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001
RU Pdl	0,0232	0,0216	0,0188	0,0270	0,0158	0,0348	–	0,1061	0,0005	0,0037	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
RU Nov	0,0134	0,0087	0,0036	0,0130	0,0004	0,0243	0,0068	–	0,1588	0,2939	0,0300	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0044	0,0009
RU Mos	0,0084	–0,0006	0,0132	0,0010	0,0004	0,0156	0,0201	0,0054	–	0,5439	0,3975	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0002
UA	0,0042	–0,0036	0,0038	0,0044	–0,0034	0,0164	0,0143	0,0023	–0,0012	–	0,5181	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0003
SI	0,0073	–0,0016	0,0245	0,0031	0,0078	0,0188	0,0271	0,0120	0,0004	–0,0009	–	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
HR	0,0357	0,0154	0,0413	0,0144	0,0172	0,0316	0,0703	0,0378	0,0171	0,0193	0,0178	–	0,0994	0,0190	0,0257	0,0000	0,0000	0,0000
BA	0,0681	0,0434	0,0680	0,0418	0,0375	0,0595	0,1051	0,0646	0,0435	0,0483	0,0525	0,0044	–	0,0148	0,0346	0,0005	0,0000	0,0000
CS	0,0541	0,0351	0,0744	0,0240	0,0442	0,0441	0,0956	0,0610	0,0328	0,0439	0,0397	0,0075	0,0103	–	0,5507	0,1981	0,0000	0,0000
MK	0,0647	0,0430	0,0764	0,0322	0,0513	0,0509	0,1109	0,0687	0,0418	0,0511	0,0462	0,0062	0,0070	–0,0008	–	0,1240	0,0000	0,0000
BG	0,0738	0,0509	0,0879	0,0351	0,0593	0,0542	0,1132	0,0803	0,0430	0,0604	0,0537	0,0205	0,0197	0,0022	0,0031	–	0,0000	0,0000
LT	0,0342	0,0256	0,0159	0,0260	0,0201	0,0166	0,0217	0,0211	0,0197	0,0206	0,0328	0,0631	0,0971	0,0843	0,0951	0,0938	–	0,3960
LV	0,0391	0,0274	0,0173	0,0261	0,0276	0,0197	0,0254	0,0304	0,0228	0,0234	0,0320	0,0640	0,1004	0,0827	0,0929	0,0892	0,0001	–
	n=1521	n=164	n=53	n=72	n=71	n=157	n=127	n=50	n=85	n=82	n=121	n=150	n=100	n=114	n=150	n=122	n=157	n=145

Skalowanie wielowymiarowe na dwuwymiarowej płaszczyźnie ujawniło pięć populacji, które z uwagi na bardzo małe względne odległości tworzyły na wykresie wyraźne skupienie. Znalazły się w nim zarówno populacje wschodniosłowiańskie (Rosjanie z okolic Moskwy, Białorusini z Polesia, Ukraińcy), zachodniosłowiańskie (Słowacy), jak i południowosłowiańskie (Słoweńcy; ryc. 21.).



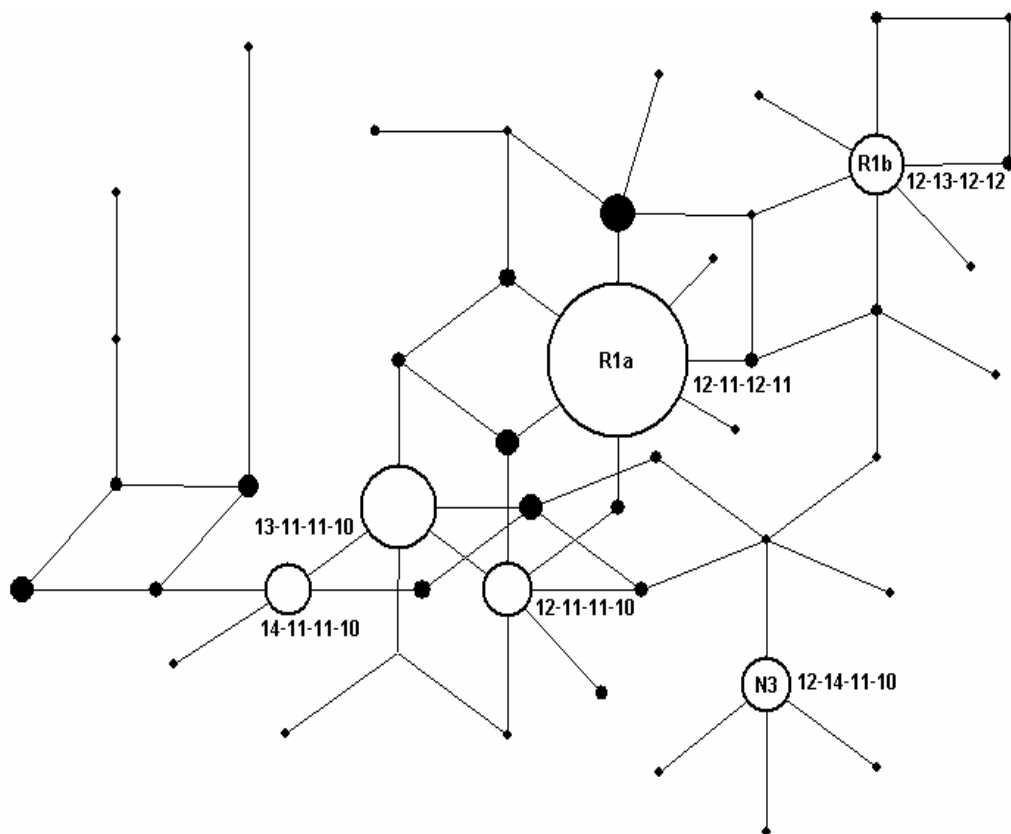
Ryc. 21. Wykres dwuwymiarowy względnych odległości między populacjami uzyskany metodą skalowania wielowymiarowego w oparciu o wartości F_{ST} dla par porównywanych populacji, obliczone metodą AMOVA w stosunku do haplotypów minimalnych.

5.6.6. ANALIZA ZMIENNOŚCI MARKERÓW Y-STR W BADANYCH POPULACJACH NA POZIOMIE HAPLOGRUP

Sieć typu „*median-joining network*” dla haplotypów obejmujących 4 loci: DYS388, DYS392, DYS426 i DYS438, dla wszystkich próbek genotypowanych przy użyciu badanego oktadekapleksu (populacje polska, słowacka i białoruska) ujawniła obecność 6 haplotypów o częstości przekraczającej 5% (ryc. 22.). Jednak tylko 3 z nich były oddzielone od siebie więcej niż jedną mutacją jednokrokową i tym haplotypom przypisano metodą częstości alleli odpowiadające im haplogrupy.

Program Y-Haplogroup Predictor 3.13 rozpoznał w badanych haplotypach haplogrupy R1a, R1b i N3 z maksymalną wartością dopasowania do haplogrupy (ang. „*fitness score*”),

równą 100 (za haplotypy o dobrze przypisanych haplogrupach przyjmuje się te o wartościach dopasowania powyżej 50). Wartości dopasowania tych haplotypów do innych haplogrup mieściły się w przedziale od 14 do 28, potwierdzając niewielkie ryzyko błędu. Najczęstszy haplotyp stanowił 44,9% wszystkich haplotypów w połączonych populacjach Polski, Słowacji i Białorusi i został zidentyfikowany jako modalny dla haplogrupy R1a.



Ryc. 22. Sieć typu „median-joining network” haplotypów Y-STR z Polski, Słowacji i Białorusi, obejmujących 4 loci: DYS388, DYS392, DYS426 i DYS438. Haplotypy przedstawione są jako koła o powierzchni proporcjonalnej do liczby obserwacji. Puste koła odpowiadają haplotypom o częstości ponad 5%. Długość linii łączących haplotypy jest proporcjonalna do liczby mutacji jednokrokowych dzielących poszczególne haplotypy. Symbole R1a, R1b i N3 odznaczają haplogrupy, dla których wybrane haplotypy są modalne.

Aby sprawdzić, czy podobieństwa i różnice między populacjami, wykazane w analizie metodą AMOVA, są w jakikolwiek sposób związane z rozkładem częstości haplogrup w analizowanych w pracy trzech populacjach, porównano częstości zbiorów modalnych dla oznaczonych haplogrup (tab. VIII).

Częstość zbioru modalnego dla haplogrupy R1a była wyższa w populacji polskiej niż w populacji środkowej Białorusi ($P = 0,006$) i populacji słowackiej ($P = 0,02$), przy czym nie

stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stosunku do mieszkańców białoruskiego Polesia ($P = 0,84$). W przypadku zbiorów modalnych dla haplogrup R1a i R1b zanotowano natomiast różnicę między południową a środkową Białorusią ($P = 0,04$). Haplotypy ze zbioru modalnego R1b były najczęstsze w populacji słowackiej, w której ich częstość była wyższa niż w populacji polskiej ($P = 0,02$) i południowej Białorusi ($P = 0,0005$), gdzie haplotypów tych w ogóle nie zaobserwowano. Haplotypy ze zbioru modalnego dla haplogrupy N3 były natomiast najliczniejsze w północnej Białorusi ($P = 0,01$ w porównaniu z populacją polską; $P = 0,001$ w porównaniu z populacją słowacką).

Tab. VIII. Częstości zbiorów modalnych dla haplogrup oszacowane w oparciu o analizę 4 loci Y-STR (DYS388, DYS392, DYS426, DYS438) w porównywanych populacjach.

	Polska (n = 208)	Słowacja (n = 164)	południowa Białoruś (n = 71)	środkowa Białoruś (n = 72)	północna Białoruś (n = 53)
R1a	0,577	0,451	0,563	0,389	0,547
R1b	0,077	0,152	0	0,083	0,057
N3	0,053	0,030	0,085	0,083	0,170

Jako że rozkład zbiorów modalnych dla haplogrup w porównywanych populacjach nie tłumaczył jednoznacznie różnic między populacją polską a jej słowiańskimi sąsiadami, analizie poddano zmienność systemów Y-STR w obrębie najczęstszego zbioru modalnego dla haplogrupy R1a. Aby zwiększyć liczebność porównywanych grup, połączono jednorodne populacje południowej i środkowej Białorusi (tab. IX).

Wyniki analizy AMOVA haplotypów ze zbioru modalnego dla haplogrupy R1a wykazały homogeniczność między populacjami słowacką i białoruską ($P = 0,19$) oraz odrębność haplotypów ze zbioru modalnego dla tejże haplogrupy w populacji polskiej ($P = 0,003$ w porównaniu ze Słowakami; $P < 0,00001$ w porównaniu z Białorusinami).

Dodatkowo zbadano występowanie alleli Y-STR w zbiorze modalnym dla haplogrupy R1a w trzech omawianych populacjach. W porównaniu do populacji wykazujących homogeniczność dla 18 loci Y-STR: słowackiej i białoruskiej, w populacji polskiej zbiór modalny dla haplogrupy R1a charakteryzował się stosunkowo niską częstością alleli DYS391*11 ($P < 0,05$) i GATA H4.1*22 ($P = 0,04$ dla populacji słowackiej; $P = 0,00003$ dla populacji białoruskiej), która w populacjach słowackiej i białoruskiej dorównywała frekwencji najczęstszych alleli. Zanotowano natomiast większą zmienność w populacji polskiej w przypadku systemów DYS19 i DYS385, gdzie allel DYS19*17 był częstszy niż w populacji słowackiej ($P = 0,03$) i białoruskiej ($P = 0,0008$). Również haplotyp DYS385*11,14 występował w populacji polskiej rzadziej niż w obu porównywanych

populacjach ($P < 0,05$). W systemie tym wykazano jednak również podobieństwa między populacją polską i słowacką, w których częściej niż u Białorusinów notowano genotyp DYS385*10,14 ($P < 0,0005$), rzadziej natomiast występował genotyp DYS385*11,15 ($P = 0,0008$ dla populacji polskiej; $P = 0,03$ dla populacji słowackiej).

Tab. IX. Częstości najliczniejszych genotypów DYS19, DYS391, GATA H4.1 i DYS385 w zbiorze modalnym dla haplogrupy R1a w porównywanych populacjach.

system	genotyp	Polska (n = 120)	Słowacja (n = 74)	Białoruś (bez Pdzv) (n = 68)
DYS19	15	0,175	0,203	0,235
	16	0,425	0,568	0,588
	17	0,383	0,230	0,147
DYS391	10	0,700	0,581	0,515
	11	0,275	0,419	0,456
GATA H4.1	21	0,767	0,595	0,471
	22	0,142	0,270	0,426
DYS385	10,14	0,300	0,203	0,015
	11,14	0,383	0,568	0,544
	11,15	0,075	0,122	0,265

Porównano również rozkład haplotypów obejmujących cztery systemy Y-STR (tab. IX), w których wykazano różnice w częstościach alleli w zbiorze modalnym dla haplogrupy R1a w populacjach polskiej, słowackiej i białoruskiej. Najliczniej występował haplotyp DYS19*16-DYS391*10-GATA H4.1*21-DYS385*11,14 o zbliżonej częstości we wszystkich trzech populacjach. Jedynie w populacji polskiej częstszy był haplotyp DYS19*17-DYS391*10-GATA H4.1*21-DYS385*10,14, stwierdzony u 20% mężczyzn ze zbioru modalnego dla haplogrupy R1a (tab. X).

Tab. X. Częstości haplotypów DYS19-DYS391-GATA H4.1-DYS385 w zbiorze modalnym dla haplogrupy R1a o częstości wyższej niż 10% przynajmniej w jednej z badanych populacji: polskiej, słowackiej lub białoruskiej.

haplotyp	Polska (n = 120)	Słowacja (n = 74)	Białoruś (bez Pdzv) (n = 68)
16-10-21-11,14	0,150	0,162	0,147
16-11-21-11,14	0,025	0,162	0,059
17-10-21-10,14	0,200	0,135	0,015

5.7. PRZYKŁADY ZASTOSOWANIA MULTIPLEKSU W USTALANIU POKREWIEŃSTWA

5.7.1. USTALENIE POKREWIEŃSTWA DOMNIEMANYCH PRZYRODNICICH BRACI

Analizowany przypadek dotyczył ustalenia pokrewieństwa dwóch dorosłych mężczyzn: Polaka i Włocha. Pierwszy z nich był synem nieżyjącego już mężczyzny, który w czasie wojny czasowo przebywał we Włoszech, drugi poszukiwał ojca w Polsce. Zlecono nam zbadanie, czy obaj mężczyźni, syn zmarłego i poszukujący ojca Włoch, są przyrodnimi braćmi.

Badaniom poddano DNA obu mężczyzn, określając profile genetyczne 19 markerów autosomalnych i 18 loci STR chromosomu Y (tabela XI). Między porównywanymi mężczyznami wykazano wspólne allele w 16 markerach autosomalnych, w 3 systemach (D21S11, TH01 i FGA) nie zanotowano wspólnych alleli. W przypadku wszystkich 18 loci Y-STR obaj mężczyźni posiadali identyczny haplotyp.

Tab. XI. Profile genetyczne 19 loci autosomalnych i 18 loci Y-STR domniemanych przyrodnich braci.

system autosomalny	Polak	Włoch	system Y-STR	Polak	Włoch
D8S1179	12/13	9/12	DYS19	16	16
D21S11	28/30	29/31.2	DYS388	12	12
D7S820	8/9	8/10	DYS389I	13	13
CSF1PO	10/12	11/12	DYS389II	30	30
D3S1358	15/18	15/16	DYS390	25	25
TH01	6/9.3	9/9	DYS391	10	10
D13S317	8/11	8/11	DYS392	11	11
D16S539	12/12	9/12	DYS393	13	13
D2S1338	17/24	20/24	DYS426	12	12
D19S433	13/14	14/15	DYS437	14	14
vWA	14/17	14/16	DYS438	11	11
TPOX	8/11	8/11	DYS439	12	12
D18S51	14/15	14/14	DYS460	11	11
D5S818	11/12	12/13	GATA H4.1	21	21
FGA	21/23	18/24	DYS385	11,14	11,14
SE33	18/19	18/26.2	YCAII	19,23	19,23
D1S80	18/24	18/18			
F13B	9/10	9/10			
F13A01	6/6	6/6			

W pierwszym etapie zbadano występowanie danego haplotypu minimalnego, wspólnego dla obu mężczyzn, w populacjach europejskich na podstawie bazy danych YHRD. W Polsce na 1313 haplotypów identyczny układ alleli markerów Y-STR występował 25 razy (wartość LR dla pokrewieństwa 50,5), zaś we Włoszech na 1340 mężczyzn badanego

haplotypu nie zanotowano ani razu. Było zatem 26,5 bardziej prawdopodobne, że haplotyp ten należał do Polaka niż do Włocha.

W przypadku systemów autosomalnych uzyskano wartość $LR = 19,7$. Natomiast dla zbliżonej liczby loci mikrosatelitarnych chromosomu Y wartość LR wyniosła 208, była więc ponad 10-krotnie wyższa. Łączna wartość LR dla markerów autosomalnych i sprzężonych z chromosomem Y dla badanego przypadku wyniosła 4097,6. Oznacza to, że było ponad 4 000 razy bardziej prawdopodobne, że obaj mężczyźni mieli wspólnego ojca, niż że byli niespokrewnieni.

Po ograniczeniu zakresu badanych markerów chromosomu Y do 9-lokusowego haplotypu minimalnego również uzyskano wartość LR wyższą niż dla systemów autosomalnych, równą 29,7. Wartość ta była jednak 7-krotnie niższa w stosunku do wartości LR dla wszystkich 18 loci Y-STR. Dla bazy danych YHRD obejmującej 1313 haplotypów minimalnych z populacji polskiej wartość LR wynosiła 50,5, również nie dorównując wartości LR dla oktadekapleksu. W celach poznawczych użyto również do obliczeń częstości oczekiwanej badanego haplotypu w populacji polskiej. Wartość LR dla 18 loci Y-STR wyniosła wówczas 1632 i była przeszło 80 razy wyższa od wartości LR dla loci autosomalnych.

Przyjmując prawdopodobieństwo *a priori* na poziomie 50%, wyniki badań genetycznych dla wartości $LR = 4097,6$ wskazały z prawdopodobieństwem *a posteriori* równym 99,98%, że porównywani mężczyźni mieli wspólnego ojca. W obecności dowodów wskazujących na pokrewieństwo między nimi już przed samym badaniem genetycznym o wartości trudnej do oszacowania oraz przy znacznie wyższej częstości danego haplotypu w Polsce niż we Włoszech (domniemany ojciec obu mężczyzn był Polakiem) wartość prawdopodobieństwa *a priori* była z pewnością znacznie wyższa. I tak przy założeniu wyższego prawdopodobieństwa *a priori* na poziomie 90% i 99%, prawdopodobieństwo *a posteriori* wyniosło odpowiednio 99,997% i 99,9998%. Wyniki pozwoliły na wydanie opinii, iż badani mężczyźni byli przyrodnimi braćmi.

Wśród spraw, w których analiza polimorfizmu chromosomu Y w oparciu o badany multipleks była kluczowa do wydania rozstrzygającej opinii przez Katedrę i Zakład Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Gdańsku, wymienić warto również ustalenie ojcostwa dziecka płci męskiej w oparciu o materiał biologiczny domniemanego dziadka oraz identyfikację mężczyzny o nieustalonej tożsamości przy wykorzystaniu materiału genetycznego jego domniemanego syna, u którego stwierdzono w locus autosomalnym niezgodność wynikającą z mutacji.

prawdopodobieństwo, że porównywani mężczyźni mieli wspólnego przodka w linii męskiej w przeciągu ostatnich 19,3 pokoleń (95% przedział ufności: 0,7–102,5).

Uzyskane wyniki analizy genetycznej potwierdzały pokrewieństwo w linii męskiej siedmiu mężczyzn o identycznych haplotypach (profile nr 1, 5, 6, 7, 12, 14, 19). W przypadku osób o profilach genetycznych nr 3, 4, 9 i 17, różniących się od haplotypu wzorcowego w dwóch miejscach genowych, nie można było jednoznacznie wypowiedzieć się na temat pokrewieństwa w linii męskiej z mężczyzną zlecającym badanie, jako że wykazane niezgodności mogły równie prawdopodobnie świadczyć o braku pokrewieństwa, jak wynikać z mutacji.

Przeprowadzone badania sugerowały natomiast w sposób mniej lub bardziej prawdopodobny brak pokrewieństwa w linii męskiej mężczyzny zlecającego badanie w stosunku do pozostałych osób, jako że oznaczone u nich haplotypy chromosomu Y różniły się od haplotypu wzorcowego w trzech lub więcej loci (profile nr 2, 8, 10, 11, 13, 15, 16, 18, 20). W przypadku haplotypów nr 10 i 13 ogromny dystans dzielący je od haplotypu wzorcowego oraz wskazujące na przynależność do innych haplogrup allele DYS388, DYS426 i DYS438 praktycznie wykluczały jakąkolwiek możliwość pokrewieństwa.

Tab. XII. Profile genetyczne 18 loci Y-STR dla 20 mężczyzn o identycznych lub zbliżonych nazwiskach. Wytluszczono haplotypy identyczne z haplotypem wzorcowym (profil nr 1), zaś kolorem czerwonym oznaczono różnice w stosunku do haplotypu wzorcowego.

Lp.	Nazwisko	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 460	GATA H4I	DYS 385	YCAII
1.	A	15	12	13	17	25	10	11	13	12	14	11	10	10	21	11,14	19,23
2.	B	17	12	13	17	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,14	19,22
3.	B	16	12	13	18	25	10	11	13	12	14	11	10	10	21	11,14	19,23
4.	B	15	12	13	17	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,2,14	19,23
5.	B	15	12	13	17	25	10	11	13	12	14	11	10	10	21	11,14	19,23
6.	B	15	12	13	17	25	10	11	13	12	14	11	10	10	21	11,14	19,23
7.	A	15	12	13	17	25	10	11	13	12	14	11	10	10	21	11,14	19,23
8.	A	16	12	13	17	25	11	11	13	12	14	11	11	11	21	11,14	19,23
9.	A	15	12	13	17	25	11	11	13	12	14	11	10	11	21	11,14	19,23
10.	A	15	15	12	16	23	9	11	12	11	15	9	11	10	20	13,17	19,21
11.	B	16	12	14	17	25	11	11	13	12	14	11	11	11	21	11,13	19,23
12.	A	15	12	13	17	25	10	11	13	12	14	11	10	10	21	11,14	19,23
13.	B	14	14	12	16	22	11	12	13	11	16	10	11	10	20	14,14	19,21
14.	B	15	12	13	17	25	10	11	13	12	14	11	10	10	21	11,14	19,23
15.	B	16	12	14	16	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,14	19,23
16.	B	17	12	12	17	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,14	19,22
17.	B	16	12	13	17	24	10	11	13	12	14	11	10	10	21	11,14	19,23
18.	C	16	12	13	18	24	12	11	13	12	14	11	10	11	22	11,15	19,23
19.	C	15	12	13	17	25	10	11	13	12	14	11	10	10	21	11,14	19,23
20.	D	17	12	13	16	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,14	19,23

A – nazwisko wzorcowe z końcówką „-ski”

B – wariant fonetyczny (mazurzący) nazwiska wzorcowego

C – wariant nazwiska „B” z końcówką „-ak”

D – wariant nazwiska „B” z końcówką „-ec”

6. DYSKUSJA

Szczególne cechy ludzkiego chromosomu Y, charakteryzującego się obecnością największego regionu w ludzkim genomie niepodlegającego rekombinacji, unikalnym sposobem dziedziczenia wyłącznie w linii męskiej oraz specyficzną w stosunku materiału genetycznego pochodzącego od mężczyzn, sprawiają, że analiza polimorfizmu sprzężonych z nim sekwencji znalazła szerokie zastosowanie w medycynie sądowej oraz w badaniach nad ewolucją gatunku ludzkiego [29, 73].

W praktyce medyczno-sądowej szczególne przydatne są markery wykazujące wysoki polimorfizm lub te o niższym polimorfizmie, które mogą być analizowane jednocześnie tak, aby możliwe była różnicowanie DNA pochodzącego od różnych osób [28]. Ze względu na powszechność występowania w ludzkim genomie, wysoki polimorfizm oraz niewielką ilość materiału biologicznego potrzebną do oznaczenia genotypu nawet silnie zdegradowanego DNA uwaga genetyków sądowych skupiła się przede wszystkim na sekwencjach mikrosatelitarnych [145].

Zestaw siedmiu mikrosatelitów chromosomu Y, nazwany haplotypem Yh1, został zarekomendowany [76], a następnie zaakceptowany do badań w praktyce medyczno-sądowej [111]. Do zestawu tego dołączono wysoce polimorficzny, dwulokusowy system DYS385 [37] i utworzono tzw. haplotyp minimalny, który następnie powiększono o kolejne dwa loci i nazwano haplotypem rozszerzonym [135].

Wydaje się, że najbardziej wartościowy pod kątem zastosowań medyczno-sądowych układ kompleksowej reakcji PCR powinien obejmować wszystkie loci Y-STR wchodzące w skład haplotypu minimalnego względnie rozszerzonego, których badanie stało się niejako standardem w analizie polimorfizmu chromosomu Y w praktyce laboratoryjnej, umożliwiając porównywanie wyników i przeszukiwanie baz danych profili DNA czy ogólnie dostępnych baz danych częstości haplotypów Y-STR. Korzystne byłoby również włączenie innych systemów rekompensujących stosunkowo niską siłę dyskryminacji i umożliwiających różnicowanie identycznych haplotypów rozszerzonych.

Do 2004 r. jedynym multipleksem pozwalającym na jednoczesną amplifikację wszystkich 11 loci haplotypu rozszerzonego wraz z kilkoma dodatkowymi systemami był multipleks 20-locusowy (ejkozapleks) opisany przez Butlera i wsp. [35]. System ten obejmuje również loci DYS438 i DYS439, zarekomendowane w 2003 r. wraz z haplotypem minimalnym do badań w praktyce medyczno-sądowej przez amerykańską Naukową Grupę

Roboczą ds. Metod Analizy DNA (SWGDM) [29], które rok później zastąpiły dwulokusowy system YCAII w haplocyfie rozszerzonym [156]. Wybór wspomnianego zestawu jako podstawy do stworzenia multipleksu stosowanego w niniejszej pracy wydaje się więc w pełni uzasadniony.

Układ kompleksowej reakcji PCR powinien być dokładnie zrównoważony poprzez optymalizację warunków reakcji, aby nie dochodziło do preferencyjnej amplifikacji określonych systemów [33]. Optymalizując parametry amplifikacji osiąga się niejako kompromis pomiędzy ilością stosowanych odczynników, bezpośrednio wiążącą się z kosztami analizy, oraz siłą sygnału amplifikacji i obecnością produktów niespecyficznych. Jednym z takich parametrów, którego wielkość proporcjonalnie wiąże się z kosztami reakcji PCR, jest objętość mieszaniny reakcyjnej. Wykazano, że zmniejszenie objętości, w której przebiega amplifikacja, znacząco podnosi czułość reakcji [90], co stanowi niewątpliwą zaletę w badaniach identyfikacyjnych. Zalecana objętość, w której prowadzi się amplifikację komercyjnych multipleksów Y-STR, wynosi 25 μ l [11, 121, 128].

W metodach analizy opartych na elektroforezie kapilarnej poprzedzonej nastrzykiem elektrokinetycznym najczęściej zużywa się zaledwie 0,5–1 μ l produktu amplifikacji [6], co teoretycznie pozwala na znaczne manipulowanie objętością, w której przebiega reakcja. Wykazany brak wpływu objętości mieszaniny reakcyjnej na wydajność amplifikacji badanych markerów pozwolił na 4-krotną redukcję ilości zużywanych odczynników w stosunku do oryginalnie opisanych ilości [35] i prowadzenie reakcji w 5 μ l. Brak produktów amplifikacji zaobserwowany jedynie przy objętości zredukowanej do 1 μ l wynikał z odparowania wody w czasie reakcji, któremu przy tak małej objętości nie zapobiega nawet pokrywa ogrzana do 110 °C. Niedawno opracowana technologia reakcji PCR w małej objętości na płytkach AmpliGrid, stworzonych m.in. pod kątem badań genetyczno-sądowych przez dwie niemieckie firmy: Advalytix AG (Brunnthal) i Alopex GmbH (Kulmbach), zdaje się omijać ten problem.

Metody detekcji produktów PCR oparte o detekcję fluorescencji wiążą się z wyższymi wydatkami w stosunku do tradycyjnego barwienia srebrem, spowodowanymi znakowaniem barwnikami fluorescencyjnymi starterów stosowanych do amplifikacji. Mimo kosztów znakowania często wielokrotnie przewyższających cenę syntezy oligonukleotydów, możliwość analizy przy użyciu różnych barwników, pozwalającej na rozróżnianie systemów o nachodzących na siebie zakresach wielkości, jest bezsprzecznym atutem tej techniki i zdecydowała o jej popularności [28]. Jednak w tym przypadku również możliwa jest pewna manipulacja kosztami poprzez stosowanie barwników fluorescencyjnych nieobjętych patentami, oferowanych przez szereg firm po konkurencyjnych cenach. Spośród zestawów

barwników stosowanych w analizie fragmentów na aparatach ABI Prism 310 jedynym zestawem barwników, w skład którego nie wchodzi barwniki ograniczone prawem patentowym jest 4-barwnikowy zestaw DS-34, wykorzystujący wirtualny zestaw filtrów C [7]. W skład dwóch pozostałych dostępnych zestawów 4-barwnikowych (filtry D i F) oraz zestawu 5-barwnikowego (filtr G5) wchodzi barwniki NED, VIC i PET, na które wyłączność posiada producent aparatu [176] i których stosowanie znacznie podwyższa koszty analizy. Dlatego też przy tworzeniu multipleksu zdecydowano o eliminacji dwóch loci Y-STR dostępnych w oryginalnym ekozestawie w analizie 5-barwnikowej, które nie stanowiły części haplotypu rozszerzonego, i w pracy wykorzystano startery znakowane barwnikami z zestawu DS-34. Mimo że zestaw ten jest najmniej polecany przez producenta w związku z potencjalnymi problemami z macierzą spowodowanymi znacznym nachodzeniem na siebie widm fluorescencji barwników 6-FAM i TET [6], analiza kilkuset próbek przy jego użyciu nie ujawniła żadnych większych problemów w porównaniu do innych stosowanych zestawów barwników.

Uzyskanie jednoczesnej amplifikacji wszystkich loci w multipleksie o równo intensywnym sygnale wymaga często żmudnych eksperymentów z dostosowywaniem stężeń starterów w mieszaninie reakcyjnej [33]. Zbalansowany sygnał amplifikacji poszczególnych systemów wielokrotnie eliminuje potrzebę ponownej elektroforezy w związku z obecnością alleli o zbyt niskim sygnale fluorescencji względnie przecieków utrudniających lub wręcz uniemożliwiających prawidłowe genotypowanie, jak również usuwa konieczność powtórzenia reakcji PCR z związku z niewydajną syntezą niektórych loci bez pewności powodzenia. Konieczność modyfikacji oryginalnych stężeń starterów [35], która w przypadku systemu DYS460 pozwoliła na uzyskanie wyważonego sygnału amplifikacji dopiero po 7-krotnym obniżeniu stężenia, wynikać mogła z eliminacji starterów dla 2 systemów dostępnych w analizie 5-barwnikowej oraz w mniejszym stopniu ze zmodyfikowanych warunków reakcji PCR (zmniejszona objętość mieszaniny reakcyjnej, mniejsza ilość DNA dodawanego do amplifikacji).

Ze względu na liczbę starterów stosowanych w kompleksowej reakcji PCR w porównaniu do standardowej techniki znacznie wyższe jest ryzyko syntezy produktów niespecyficzných oraz dimeryzacji starterów [108], spowodowane niewielką, ale mierzalną aktywnością termostabilnej polimerazy DNA w temperaturze pokojowej, prowadzącą do niespecyficznego wydłużania starterów przed rozpoczęciem właściwej amplifikacji [41]. Ominięcie tego problemu umożliwia prowadzenie reakcji PCR w technologii *hot-start*, w której do aktywacji polimerazy dochodzi wraz z denaturacją DNA w pierwszym etapie

procesu. Polega ona na dodaniu polimerazy bądź starterów po osiągnięciu przez mieszaninę reakcyjną odpowiednio wysokiej temperatury [107], mechaniczne rozdzielanie w próbówce polimerazy i starterów warstwą parafiny topniejącej w wysokiej temperaturze [41] oraz wstępne zablokowanie starterów przy użyciu białek wiążących jednoniciowy DNA [108, 160] względnie polimerazy przy użyciu przeciwciał monoklonalnych [82] lub poprzez jej chemiczną modyfikację.

Z uwagi na prostotę i brak konieczności dodatkowych manipulacji na próbówce z badanym materiałem w genetyce sądowej największą popularność zdobyło ostatnie rozwiązanie, które zastosowane zostało w przypadku polimerazy AmpliTaq Gold [81, 101]. Olszewski i wsp. [108] wykazali, że w kompleksowej reakcji PCR dimery tworzone zaledwie przez dwa startery są w stanie zablokować amplifikację wszystkich loci w multipleksie, zaś prowadzenie reakcji w technologii *hot-start* wyraźnie obniża efektywność syntezy produktu dimeryzacji i umożliwia amplifikację pożądaných fragmentów DNA. Znaczne ilości krótkich produktów niespecyficznych oraz brak amplifikacji właściwych produktów PCR przy użyciu zwykłej polimerazy *Taq* w przypadku badanego oktadekapeksu wynikały więc z powstawania dimerów starterów oraz niespecyficznego wiązania starterów do matrycy, które ulegały wydłużaniu już w czasie przygotowywania reakcji, zaś niewielki rozmiar produktów dimeryzacji starterów i/lub produktów niespecyficznych w stosunku do badanych mikrosatelitów umożliwiał preferencyjną amplifikację niepożądanych fragmentów DNA. Krótkich produktów niespecyficznych praktycznie nie obserwowano stosując do badań polimerazę AmpliTaq Gold, do której pełnej aktywacji dochodzi wraz obniżeniem pH buforu w odpowiednio wysokiej temperaturze [28].

Stosowanie polimerazy AmpliTaq Gold wiąże się jednak ze znacznymi kosztami w porównaniu do niezmodyfikowanej formy tego enzymu. Dla porównania koszt polimerazy stosowanej w amplifikacji badanego oktadekapeksu sześciokrotnie przewyższa koszt użytych starterów. Zmniejszenie dodawanej do reakcji ilości enzymu nie było jednak możliwe, ponieważ prowadziło do obniżenia wydajności syntezy największych fragmentów oraz powstawania produktów niespecyficznych, wynikających z niepełnej adenylacji końców 3' produktów amplifikacji. Produkty te szczególnie często pojawiały się w przypadku systemu DYS385 mimo obecności dodatkowej guanozyny na końcu 5' startera *reverse* [35], stymulującej niezależne od matrycy przyłączenie pojedynczego nukleotydu [25, 92]. Jednak nawet w przypadku tego systemu amplifikacja w zoptymalizowanych warunkach w obecności 0,5 jednostki polimerazy w 5 μ l mieszaniny reakcyjnej dostarczała produktów nieadenylowanych w niewielkiej ilości, nie utrudniającej interpretacji wyników.

Pewnym rozwiązaniem dla wysokich kosztów związanych z polimerazą AmpliTaq Gold jest natomiast nieustannie rosnąca na rynku oferta w zakresie termostabilnych polimeraz DNA aktywowanych termicznie, co stwarza możliwość zastąpienia najbardziej kosztownego składnika reakcji jego tańszym odpowiednikiem, a tym samym znaczne zmniejszenie kosztów analizy genetycznej w praktyce. I tak np. użycie do badań polimerazy *Taq* zablokowanej przeciwciałem monoklonalnym, oferowanej przez rodzimego producenta, ponad trzykrotnie obniża koszt użycia tego katalizatora w pojedynczej reakcji. Jednakże mimo stosowania polimerazy AmpliTaq Gold amplifikacja badanego oktadekapleksu wiąże się nawet z 10-krotnie niższymi kosztami (przy przeliczeniu na jednakową objętość mieszaniny reakcyjnej) w porównaniu do dostępnych na rynku zestawów komercyjnych do analizy polimorfizmu Y-STR.

Ważnym czynnikiem wpływającym na obraz amplifikacji jest ilość matrycowego DNA, ponieważ od ilości kopii matrycy zależy prawdopodobieństwo efektywnego przyłączania starterów w pierwszych cyklach reakcji [87]. Przy zbyt wysokich stężeniach DNA rośnie ryzyko wiązania się starterów do miejsc nie w pełni komplementarnych, co obserwowano w postaci produktów niespecyficzných. Zbyt mała ilość DNA w mieszaninie reakcyjnej może natomiast prowadzić do niewydajnej amplifikacji i wypadania alleli, niosąc ryzyko uzyskania niepełnych, niekiedy nieprawidłowych wyników genotypowania. Dlatego też niezwykle istotne znaczenie ma prawidłowe oznaczenie stężenia DNA po izolacji [67].

W niniejszej pracy zoptymalizowano warunki amplifikacji i elektroforezy dla dwóch najczęściej stosowanych w praktyce stężeń DNA: 10 ng/μl [99, 129, 170] i 0,1 ng/μl [9], które pozwalają przy dodawaniu matrycy do reakcji PCR na manipulowanie objętością bez konieczności wykonywania kolejnych rozcieńczeń. Z roztworów DNA o powyższych stężeniach do amplifikacji dodawano odpowiednio 5 ng lub 0,2 ng kwasu deoksyrybonukleinowego i dla tych ilości przeprowadzono optymalizację. Oprócz nastrzyku elektrokinetycznego decydującego o wysokości pików na elektroforogramie [6] konieczne okazało się również oddzielne dostosowanie stężeń starterów, jako że obserwowany stosunek sygnału amplifikacji poszczególnych systemów był różny dla obu ilości DNA, co było najbardziej zauważalne w przypadku systemów DYS426, DYS437 i GATA H4.1.

Parametrem, od którego niekiedy zależy sukces amplifikacji i genotypowania, jest czułość multipleksu. W przypadku elektroforogramów uzyskiwanych na aparacie ABI Prism 310 za minimalną wysokość pików świadcząca o obecności danego allelu przyjmuje się 150 względnych jednostek fluorescencji. Poniżej tego poziomu stosunek sygnału do szumów jest zbyt niski, by rozróżnić piki pochodzące z badanej próbki od fluktuacji tła [6]. Dla

podniesienia czułości korzystne jest zwiększenie liczby cykli amplifikacji i nastrzyku elektrokinetycznego. Napięcie towarzyszące natrzykowi próbki amplifikowanej przy niskich stężeniach DNA wynosiło 15 kV i wykluczone było dalsze zwiększenie tego parametru. Możliwe było natomiast niewielkie wydłużenie czasu nastrzyku, jednak w przypadku nastryków dłuższych niż 10 s nie obserwuje się poprawy siły sygnału dla dłuższych fragmentów i dodatkowo dochodzi do obniżenia rozdzielczości [6].

W zoptymalizowanych warunkach reakcji PCR i elektroforezy pełny profil uzyskiwano przy 0,1 ng genomowego DNA mężczyzny i 28 cykli amplifikacji, dorównując czułością komercyjnemu zestawowi Y-PLEX 12 przy 30 cyklach amplifikacji [128]. Inni producenci nie podają minimalnej czułości swoich megapleksów do analizy polimorfizmu markerów Y-STR, zalecają jedynie dodawanie do amplifikacji 0,5–1 ng DNA przy 30–32 cyklach amplifikacji [11, 121]. Wydaje się więc, że zastosowany w pracy układ kompleksowej reakcji PCR charakteryzuje się najwyższą czułością w porównaniu do zestawów komercyjnych, która potencjalnie może być nawet podwyższona poprzez zwiększenie liczby cykli i (w mniejszym stopniu) wydłużenie czasu nastrzyku elektrokinetycznego.

Stosowanie w amplifikacji badanego oktadekapeksu niewielkich stężeń DNA wiązało się z uwidacznianiem się pików odpowiadających wolnym barwnikom fluorescencyjnym, towarzyszącym nieoczyszczonym starterom (tzw. kleksów), które przy niskim sygnale amplifikacji były relatywnie wysokie. Rozwiązaniem tej sytuacji może być stosowanie do amplifikacji starterów znakowanych fluorescencyjnie, dodatkowo oczyszczonym metodą HPLC [35], lub też oczyszczanie produktów PCR przed elektroforezą [36]. W przypadku badanego multipleksu nie było to jednak konieczne, jako że piki odpowiadające niezwiązanym barwnikom z uwagi na swój poszerzony kształt nie były rozpoznawane przez program GeneScan 3.7 jako produkty amplifikacji i ich obecność nie utrudniała identyfikacji prawidłowych alleli.

W przypadku systemów autosomalnych próby amplifikowane przy zwiększonej liczbie cykli powinny być genotypowane ostrożnie, ponieważ dla bardzo małych ilości heterozygotycznego DNA istnieje duże prawdopodobieństwo nierównomiernego rozkładu cząsteczek DNA dla obu alleli i wypadnięcia jednego z nich przy amplifikacji [116]. Markery sprzężone z haploidalnym chromosomem Y są hemizygotyczne, w związku z czym zwiększenie liczby cykli przy małych ilościach matrycowego DNA nie niesie ze sobą ryzyka nieprawidłowego genotypowania i może być z powodzeniem zastosowane do zwiększenia czułości systemu. Zjawisko wypadania alleli obserwowano jedynie w przypadku systemów

dwulokusowych: DYS385 i YCAII. Problem ten może być rozwiązany poprzez dostosowanie liczby cykli reakcji PCR tak, aby genotyp oznaczany był po amplifikacji co najmniej 20 kopii matrycowego DNA (u człowieka ok. 60 pg). Potwierdzają to wyniki niniejszej pracy, bowiem znaczną różnicę w wysokości alleli obu systemów obserwowano przy 50 pg genomowego DNA mężczyzny, zaś przy 25 pg DNA dochodziło do amplifikacji tylko jednego allelu. Standardowe stosowanie 200 pg DNA do amplifikacji, która to ilość zawiera ponad 60 kopii alleli loci dwulokusowych i dwukrotnie przewyższa empirycznie ustaloną czułość multipleksu, nie niesie więc ryzyka błędnego genotypowania nawet takich systemów jak DYS385 i YCAII.

Aby możliwe było porównywanie profili uzyskiwanych w różnych laboratoriach i aby wyniki były zgodne w przypadku materiału genetycznego pochodzącego od tej samej osoby, Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Sądowej regularnie publikuje zalecenia odnośnie nazewnictwa systemów i ich alleli, oznaczanych w badaniach genetyczno-sądowych [16, 51]. Mimo tych rekomendacji w przypadku takich systemów jak DYS437 i DYS439 w piśmiennictwie spotyka się nawet 4 różne sposoby nazywania alleli [58]. Problem ten regulują dopiero najnowsze zalecenia [57], które zostały wykorzystane w niniejszej pracy.

Spośród badanych markerów na szczególną uwagę zasługuje system GATA H4, jako że istnieje możliwość projektowania starterów omijających 7 jednostek repetytywnych należących do locus GATA H4.2 [58], w obrębie którego nie można wykluczyć polimorfizmu. Stąd też konieczne jest sprawdzenie, która część tego złożonego systemu podlega amplifikacji i stosowanie odpowiedniego nazewnictwa. Używane w badanym oktadekapeksie startery obejmują jedynie locus GATA H4.1. Producent komercyjnego zestawu Yfiler nie podaje nomenklatury zastosowanej w nazywaniu alleli [11], jednak wydaje się, że w przypadku niektórych systemów próbki powinny być genotypowane ostrożnie. Nie dotyczy to loci haplotypu minimalnego oraz systemów DYS437, DYS438 i DYS439, dla których w przypadku badanego oktadekapeksu i trzech porównywanych zestawów komercyjnych uzyskiwano identyczne wyniki genotypowania. Zidentyfikowanych 7 alleli GATA H4 w zakresie 24–30 [61] obejmuje motyw jednostek repetytywnych o długości 120–144 bp, który w analizie metodą PCR jest większy co najmniej o długość obu starterów (na przykładzie badanego oktadekapeksu średnio o 46 bp). Wielkość 6 alleli GATA H4, oznaczonych przy użyciu zestawu Yfiler na aparacie ABI Prism 310, mieści się w przedziale 122,01–142,37 bp [11], co świadczy, że zestaw Yfiler amplifikuje jedynie locus GATA H4.1. Porównanie alleli GATA H4.1 oznaczanych przy użyciu badanego multipleksu i zestawu Yfiler pokazuje, że allele oznaczone zestawem komercyjnym są krótsze o 9 jednostek

repetytywnych, co sugeruje stosowanie nazewnictwa zaproponowanego przez Butlera i wsp. [35]. Dlatego zgodnie z zaleceniami ISFG locus amplifikowane przy użyciu zestawu Yfiler powinno nosić nazwę GATA H4.1, zaś do numeru allelu oznaczonego tym zestawem powinno być dodanych 9 jednostek repetytywnych. W związku z powyższym nie ma pewności, że dla pozostałych 4 loci tego zestawu (DYS448, DYS456, DYS458, DYS635) genotypy oznaczane są zgodnie z zaleceniami ISFG.

Narzędziem niezwykle ważnym w genotypowaniu markerów wykazujących polimorfizm VNTR, amplifikowanych metodą PCR, są drabiny alleli [148]. Powinny one stanowić nieodłączny element każdego multipleksu. W przypadku markerów STR o niewielkich różnicach wielkości pomiędzy poszczególnymi allelami porównywanie produktów amplifikacji z drabinami pozwala na bezbłędne typowanie mikrowariantów. W elektroforezie kapilarnej wykazanie allelu różniącego się wielkością od allelu w drabinie o więcej niż 0,5 bp zawsze wymaga weryfikacji w celu potwierdzenia obecności mikrowariantu i wykluczenia błędu pomiaru [11].

Zgodnie z zaleceniami ISFG [16] przy tworzeniu drabiny dla badanego multipleksu poszczególne allele zostały poddane sekwencjonowaniu tak, aby można im było przypisać odpowiednią liczbę jednostek repetytywnych odpowiadającą nazwie allelu. W przypadku megapleksów ostateczna drabina składa się co najmniej z kilkudziesięciu różnych alleli, w związku z czym oddzielna amplifikacja każdego allelu, łączenie w drabinę dla danego systemu i mieszanie poszczególnych drabin w odpowiednim stosunku prowadzi do wielokrotnego rozcieńczenia produktów amplifikacji i zaniku sygnału fluorescencji. Niektórzy autorzy w oznaczaniu alleli megapleksów opierają się wyłącznie na wielkościach oznaczonym programem GeneScan 3.7 [35, 156]. Metoda ta wykorzystana została w badaniach populacyjnych we Włoszech [22] i zaobserwowane przez autorów niesłuchanie wysokie częstości bardzo rzadko notowanych alleli $DYS388*11$, $DYS426*10$ i $YCAII*16$ wskazują, że tego typu podejście niesie ogromne ryzyko błędów. W niektórych pracach opisujących megapleksy w ogóle nie pojawia się wzmianka o metodzie genotypowania alleli [66], zaś autorzy, którzy stosują drabiny, nie podają metod ich otrzymywania [152].

Zaprezentowana w niniejszej pracy metoda otrzymywania drabin alleli dla megapleksów poprzez oddzielną amplifikację każdego allelu i zagęszczanie przy użyciu filtracji odśrodkowej pozwoliła na stworzenie drabin dla poszczególnych systemów o porównywalnej sile każdego allelu i wysokim sygnale fluorescencji, pozwalającym na późniejsze mieszanie poszczególnych drabin bez ryzyka utraty sygnału na skutek

rozcieńczenia. Metoda ta może być z powodzeniem wykorzystana w przyszłości w badaniach nad układami kompleksowej reakcji PCR i w praktyce medyczno-sądowej.

Niezwykle istotne w projektowaniu multipleksów jest dobieranie starterów tak, aby zakresy wielkości produktów amplifikacji systemów znakowanych tym samym barwnikiem fluorescencyjnym nie pokrywały się, umożliwiając jednoznaczne przypisanie danego produktu PCR konkretnemu markerowi [28]. W oparciu o tę zasadę stworzony został ejkozapleks (multipleks obejmujący 20 loci Y-STR) Butlera i wsp. [35]. Wykonane badania wykazały jednak pokrywanie się zakresów wielkości systemów DYS393 i YCAII, mimo że obliczona wielkość allelu YCAII*11 była większa o 2 bp od niestwierzonego w badanych populacjach allelu DYS393*16 [35]. Wynika z tego, że samo obliczenie wielkości produktów PCR jest niewystarczające do uniknięcia tego typu sytuacji. Dlatego przy tworzeniu multiplesu konieczne jest również empiryczne wyznaczenie wielkości znanych alleli przy amplifikacji daną parą starterów, gdyż na ruchliwość elektroforetyczną fragmentów DNA istotnie wpływać może również skład nukleotydów [120].

Wpływ ten potwierdza również różna ruchliwość elektroforetyczna dwóch identycznej długości alleli DYS392*11, różniących się jedynie jednym nukleotydem. Na uwagę zasługuje fakt, że dostępne zestawy komercyjne pozwalają na identyfikację allelu DYS392*11 (U180C→G) jako allelu DYS392*11 (Y-PLEX 12) lub podobnie jak w przypadku badanego oktadekapleksu jako allelu „10.2” (PowerPlex Y i Yfiler). Wynika to z faktu, że startery stosowane w zestawie Y-PLEX 12 rozpoznają sekwencje położone wewnątrz w stosunku do miejsca polimorfizmu SNP. Identyczny allel zaobserwowano dotychczas w próbce pochodzącej z Azji Środkowej [John M. Butler, informacja ustna]. Jako że właściwości omawianego allelu powodują różnice w genotypowaniu locus DYS392 przy użyciu różnych par starterów, w przyszłości należy poddawać sekwencjonowaniu każdy allel „10.2” wykazany przy użyciu badanego oktadekapleksu, jak i obu wspomnianych zestawów komercyjnych, aby jego nazwa była zgodna ze standardową nomenklaturą i wykluczała możliwe rozbieżności. Jest to tym bardziej istotne, że obecność allelu „10.2” wynikać może również z delecji 1 bp w pobliżu sekwencji repetytywnej mikrowariantu zaobserwowanego w próbce pochodzącej z Danii [14], który zgodnie z najnowszymi zaleceniami ISFG należałoby nazwać DYS392*11 (U25del). W przyszłości może być również zasadne stosowanie w praktyce wyłącznie starterów DYS392 zaprojektowanych tak, by stosunkowo odległe od sekwencji repetytywnej miejsce transwersji C→G było poza ich zasięgiem, jak to uczyniono w przypadku delecji występującej w regionie flankującym sekwencję repetytywną locus DYS385 [57].

Przy tworzeniu multipleksu w przypadku wystąpienia cichych alleli warto ustalić, czy ich obecność wynika z delecji czy też jest skutkiem polimorfizmu w miejscu przyłączenia startera, jako że druga ze wspomnianych sytuacji może powodować różnice w genotypach oznaczanych przy użyciu różnych par starterów. Najprostszym rozwiązaniem tego problemu jest dodanie do amplifikacji startera zdegenerowanego, rozpoznającego dany polimorfizm [28], co wykorzystano np. w eliminacji cichych alleli obserwowanych przy amplifikacji zestawem AmpFISTR Profiler Plus w locus D8S1179 w populacji wyspy Guam [9]. W badanych populacjach zaobserwowano pojedynczy cichy allel DYS19, przy czym wykazano, że brak amplifikacji tego systemu spowodowany był delecją, w związku z czym modyfikacja starterów DYS19 w oktadekapsie nie była konieczna.

Porównanie haplotypów minimalnych w subpopulacjach z różnych regionów Polski z ośrodkami w 6 dużych miastach: Gdańsku, Bydgoszczy, Krakowie, Lublinie, Warszawie i Wrocławiu, wykazało homogeniczność, najprawdopodobniej wynikającą z odziedziczonego po słowiańskich przodkach jednorodnego substratu genetycznego, eksterminacji i wysiedleń mniejszości narodowych w czasie i po zakończeniu II wojny światowej i/lub przemieszania populacji polskiej na skutek powojennych migracji [117]. Dlatego, mimo że w badaniach polimorfizmu mikrosatelitarnego chromosomu Y w populacji polskiej dominowali mężczyźni urodzeni w północnej części kraju, stworzona baza danych częstości haplotypów obejmujących 18 loci Y-STR może być traktowana jako reprezentacyjna dla całej populacji polskiej.

Dane te są tym cenniejsze, że w badaniach polimorfizmu chromosomu Y w populacji polskiej prezentowane były dane jedynie dla 9-locusowych haplotypów minimalnych [117]. Dotychczas nie publikowano natomiast częstości w populacji polskiej haplotypów rozszerzonych zarówno w oryginalnym zestawie z systemem YCAII, jak i po jego zastąpieniu systemami DYS438 i DYS439 (tak zmodyfikowany haplotyp rozszerzony jest obecnie zalecany w badaniach identyfikacyjnych przez SWGDAM [156], zaś wyniki jego genotypowania gromadzone są w bazie danych YHRD [YHRD, edycja 17]). Niniejsza praca prezentuje częstości występowania w populacji polskiej haplotypów chromosomu Y poszerzonych łącznie o 9 miejsc genowych.

Uzyskane dane mogą być również uznane za reprezentacyjne dla osób narodowości polskiej w badaniach filogenetycznych, jako że Polska jest krajem praktycznie jednolitym narodowościowo i mimo braku wywiadu przy doborze próbek do badań margines błędu jest niewielki. W oparciu o wyniki spisu powszechnego w 2002 r. mniejszości narodowe stanowiły zaledwie 1,2% ludności Polski [53]. Ponadto 80% mniejszości narodowych

zamieszkiwało województwa śląskie, opolskie i podlaskie, a więc geograficznie odległe od regionu, z którego pochodziło większość badanych mężczyzn.

Jako że standardowo oznaczany haplotyp minimalny charakteryzował się niewystarczająco wysoką siłą dyskryminacji do zastosowań w praktyce medyczo-sądowej, zestaw ten wkrótce poszerzono o wysoce polimorficzny dwulokusowy system YCAII [135, 137]. Z uwagi na występowanie powtórzeń dwunukleotydowych jego amplifikacja generuje znaczny udział produktów typu *stutter* [13] i z tego powodu został on zastąpiony markerami DYS438 i DYS439 [156]. Obecność produktów typu *stutter* o wysokiej sile sygnału utrudnia przede wszystkim interpretację profili mieszanych, gdyż artefakty te posiadają rozmiary odpowiadające właściwym allelom.

W analizie DNA pochodzącego od jednej osoby, z jakim ma się do czynienia w ogromnej większości przypadków w badaniach populacyjnych i w analizie pokrewieństwa, interpretacja wyników amplifikacji loci STR o powtórzeniach dwunukleotydowych nie budzi wątpliwości [130]. Dlatego też w przypadku systemu YCAII charakteryzującego się obecnością wielokrotnie powtórzonej jednostki dwunukleotydowej silna amplifikacja produktów typu *stutter* nie powodowała jakichkolwiek problemów z genotypowaniem. Fakt, że marker ten zwiększał udział różnych haplotypów zdeponowanych w bazie danych YHRD z 41% do 65%, decyduje o dużej wartości tego systemu w badaniach pokrewieństwa [130]. W przyszłości jednak może być celowe jego zastąpienie w multipleksie innym systemem pod kątem szerszej pojętych badań identyfikacyjnych.

Z uwagi na haploidalność oraz sprzężenie polimorficznych loci znajdujących się na chromosomie Y potrzeba znacznie więcej markerów Y-STR, aby osiągnąć siłę dyskryminacji i szansę wykluczenia ojcostwa zbliżoną do często leżących na różnych chromosomach bądź podlegających rekombinacji loci autosomalnych [23]. Ponadto wykazano, że haplotypy minimalne w populacji polskiej charakteryzują się niższą wartością zróżnicowania genetycznego w porównaniu do innych populacji europejskich [117], stąd analiza większej liczby markerów jest zdecydowanie pożądana. Celowość zwiększenia zestawu markerów najbardziej potwierdza fakt, że wśród 568 zbadanych w niniejszej pracy mężczyzn haplotypy pojedyncze stanowiły zaledwie połowę wszystkich haplotypów minimalnych i aż 80% haplotypów oznaczonych badaniem oktadekpleksem. Jednak nawet przy analizie aż 18 loci Y-STR oznaczona wartość siły dyskryminacji i szansy wykluczenia ojcostwa dla badanych haplotypów, sięgająca 99,9%, jest nieporównywalnie niższa od wartości uzyskiwanych dla zbliżonej liczby markerów diploidalnych [171].

Kilkulokusowe markery Y-STR cechuje najwyższa wartość zróżnicowania genetycznego i największa liczba obserwowanych kombinacji alleli [127, 156], co wynika z niezależnej zmienności w obrębie każdego locus.

Jednym z najbardziej polimorficznych markerów mikrosatelitarnych chromosomu Y jest czterolokusowy system DYS464 [21]. Obserwacje te potwierdzają zaprezentowane w pracy wyniki badań populacyjnych wykonane dla trzech populacji słowiańskich Europy Środkowo-Wschodniej, które pokazują, że najbardziej polimorficznymi układami były dwulokusowe systemy DYS385 i DYS389. Jednakże wadą systemów kilkulokusowych (z wyjątkiem systemu DYS389, którego amplifikacja w danym zakresie wielkości dostarcza tylko jednego produktu i nie ma wątpliwości, który fragment odpowiada danemu locus) jest ryzyko wypadania alleli przy małych ilościach DNA. Ponadto występują problemy z interpretacją profili mieszanych, związane z mniejszym prawdopodobieństwem detekcji alleli pochodzących od innej osoby oraz utrudnioną oceną liczby profili składających się na profil mieszany i pochodzenia alleli na podstawie wysokości pików, która w przypadku tak złożonego systemu jak DYS464 może być zróżnicowana nawet w przypadku DNA pochodzącego od jednego mężczyzny [156].

Niemożność przypisania alleli różnym loci w przypadku kilkulokusowych systemów Y-STR niekiedy komplikuje również analizę pokrewieństwa w przypadku mutacji oraz w badaniach genealogicznych. Mimo bardzo wysokiego polimorfizmu wydaje się mało prawdopodobne, by kolejne systemy kilkulokusowe znalazły większe zastosowanie w praktyce medyczno-sądowej, przede wszystkim z uwagi na znaczny wybór do badań markerów jednolokusowych, zidentyfikowanych niedawno przez Kaysera i wsp. [77].

Przeprowadzone badania wykazały, że kilka jednolokusowych systemów posiadało wyższe wartości zróżnicowania genetycznego niż dwulokusowy układ YCAII, który był jednym z najbardziej polimorficznych markerów w zestawie obejmującym DNA izolowany od 74 mężczyzn i 2 kobiet pochodzących z różnych populacji na świecie [127], stworzonym przez Konsorcjum ds. Chromosomu Y [182], jak również w trzech grupach etnicznych w Stanach Zjednoczonych [156]. Najniższy polimorfizm spośród wszystkich markerów wykazywały systemy DYS392 i DYS393, które należą do najbardziej popularnego zestawu loci Y-STR badanych w laboratoriach genetyczno-sądowych, tworzącego haplotyp minimalny.

Wykazano, że porównanie zróżnicowania genetycznego nie w pełni oddaje wartość włączenia markera do zestawu loci Y-STR [156], zbadano więc wpływ eliminacji danego systemu z oktadekapleksu na jego zdolność do dyskryminacji. Wprowadzony do obliczeń

w niniejszej pracy udział markera Y-STR w zdolności multipleksu do dyskryminacji koreluje z liczbą haplotypów identycznych we wszystkich loci z wyjątkiem badanego systemu i odpowiada jego przydatności w rozróżnianiu podobnych haplotypów [131]. Wielu autorów badało dotychczas jedynie wpływ poszerzenia haplotypu minimalnego o kolejny system [19, 56], natomiast omawiany parametr pozwala na niezależną ocenę wartości każdego układu w multipleksie. Na przykładzie populacji polskiej można zaobserwować, że jego wartość absolutnie nie koreluje z polimorfizmem danego systemu, gdyż eliminacja systemu DYS389 obniża zdolność do dyskryminacji o 9,4%, podczas gdy wartość ta spada o 6,8% w przypadku odrzucenia najbardziej polimorficznego systemu DYS385. W tej samej populacji 4 systemy (DYS388, DYS393, DYS426 i DYS438) nie miały jakiegokolwiek wpływu na zdolność do dyskryminacji nawet przy jednoczesnej eliminacji wszystkich 4 markerów.

Najciekawsza obserwacja dotyczy wysoce polimorficznego locus DYS438, który razem z markerem DYS439 jest jednym z dwóch mikrosatelitów, który zastąpił YCAII w bazie danych YHRD i jest zalecany w analizie genetycznej przez SWGDAM. Jego stosunkowo wysokie zróżnicowanie genetyczne nie ma jakiegokolwiek wpływu na wzrost wartości HD i ZD. Podczas gdy przy włączeniu locus DYS439 do haplotypu minimalnego wartość ZD w populacji polskiej rośnie o 9,6%, dalsze rozszerzenie zestawu o DYS438 zwiększa ZD jedynie o 0,6%, co odpowiada podniesieniu liczby różnych haplotypów zaledwie o jeden.

Uważa się, że decyzja o włączeniu nowych markerów do powszechnie stosowanego zestawu loci Y-STR powinna być poprzedzona szeroko zakrojonymi badaniami populacyjnymi [19]. Oprócz trzech badanych populacji słowiańskich ograniczoną wartość systemu DYS438 w genetyce sądowej zaobserwowano również w geograficznie i etnicznie odległej populacji portugalskiej [56]. Dlatego też jest wielce prawdopodobne, że jego redundancja potwierdzi się również w innych populacjach, sugerując celowość zastąpienia DYS438 w bazie danych YHRD markerem o większej informatywności.

Wiele wysiłku włożono w stworzenie bazy danych YHRD, która jest niezwykle przydatna w praktyce medyczno-sądowej w szacowaniu częstości haplotypów Y-STR [135, 137], jednakże włączone w nią markery wybrane zostały z bardzo ograniczonej liczby mikrosatelitów chromosomu Y dostępnych do badań.

Przedstawione wyniki wskazują, że niektóre loci tworzące haplotyp rozszerzony (DYS392 i DYS393) należą do najmniej polimorficznych w badanych populacjach. Ponadto jednoczesna analiza wielu markerów Y-STR przy pomocy megapleksów powoduje, że informacja genetyczna uzyskiwana poprzez genotypowanie takich systemów jak DYS438

staje się zbyt duża. Obserwacje te, jak również liczba aktualnie dostępnych do badań loci mikrosatelitarnych chromosomu Y, rozpowszechnienie w badaniach megapleksów oraz dostępność baz danych obejmujących wiele różnych systemów chromosomu Y genotypowanych w różnych populacjach mogą w przyszłości umożliwić wybór najbardziej wartościowych markerów i redefinicję zestawu loci Y-STR rekomendowanego do badań w genetyce sądowej.

Różnice etniczne, językowe i kulturowe oraz zmieniające się granice polityczne stanowią potencjalne czynniki blokujące swobodny przepływ genów między populacjami. Uzyskane wyniki wskazują, że rozkład haplotypów Y-STR nie odzwierciedla powiązań językowych, kulturowych i historycznych między populacjami słowiańskimi. Mimo bliskiego pokrewieństwa językowego Polaków i Słowaków oraz kilku stuleci wspólnej historii ziem współczesnej Polski i Białorusi, haplotypy Y-STR w populacji polskiej różniły się od haplotypów obserwowanych w obu sąsiednich narodach słowiańskich. Z drugiej strony analiza haplotypów chromosomu Y obejmujących 18 loci STR wykazała homogeniczność między populacją słowacką i dwiema subpopulacjami białoruskimi, mimo że Słowacy i Białorusini są rozdzieleni geograficznie, używają języków należących od różnych grup w obrębie słowiańszczyzny i w swojej historii nigdy wchodziłi w skład jednego organizmu państwowego.

Analiza haplotypów minimalnych w wielu populacjach słowiańskich potwierdziła brak jakiegokolwiek związku między językowym i historyczno-kulturowym podziałem Słowian a występowaniem haplotypów Y-STR.

Najbardziej wyraźną różnicę pod względem genetycznym zaobserwowano między Słowianami „północnymi” (wschodnimi i zachodnimi) a południowymi, którzy na przełomie IX i X wieku zostali rozdzieleni najazdem ugrofińskich Węgrów [167]. Jednakże z uwagi na wykazaną genetyczną bliskość językowo i geograficznie południowosłowiańskich Słoweńców w stosunku do ludów północnej Słowiańszczyzny, różnic tych nie można jednoznacznie wytłumaczyć rozdzieleniem obu grup Słowian barierą zwartej osadnictwa austriacko-węgiersko-rumuńskiego. Podobne różnice zanotowano uprzednio między Bułgarami i pozostałymi populacjami słowiańskimi, co próbowano wyjaśnić obecnością chromosomów Y azjatyckich ludów ugrofińskich i tureckich, które osiedliły się w dorzeczu Dunaju i na Bałkanach [134]. Jednakże wartości F_{ST} uzyskane przy porównaniu haplotypów minimalnych Węgrów i Turków z haplotypami wszystkich dostępnych populacji słowiańskich są większe od zera istotnie w sensie statystycznym (dla populacji węgierskiej: $P < 0,01$ w porównaniu ze środkową Białorusią, $P \leq 0,0001$ we wszystkich pozostałych porównaniach; dla populacji

tureckiej: $P < 0,00001$ we wszystkich porównaniach), zaś jedyną grupą plemion tureckich, która uległa asymilacji z miejscową populacją w regionie, byli Protobułgarzy. Do sławizacji Turków w imperium osmańskim (najczęściej wiążącej się z przyjęciem chrześcijaństwa) dochodziło niezwykle rzadko, natomiast o wiele częstsze było przejmowanie religii panującej przez miejscowych Słowian, co m.in. dało podstawy do ukształtowania się narodu bośniackiego [106]. Potwierdza to również analiza markerów Y-SNP i Y-STR w Chorwacji, która wykazała istotny udział chromosomów Y pochodzenia azjatyckiego tylko na jednej z czterech badanych wysp [17]. Wydaje się więc, że udział chromosomów Y ludów zamieszkujących region przed wędrówkami ludów w Europie w IV–VII wieku w puli genetycznej południowych Słowian stanowi najbardziej prawdopodobne wyjaśnienie tego zjawiska. Wskazują na to również ślady dawnego wspólnego języka w postaci bałkańskiej ligi językowej obejmującej słowiańskie i niesłowiańskie języki Półwyspu Bałkańskiego [54, 106] oraz wysoka częstość haplotypów z haplogrupy I1b*, praktycznie nienotowanej poza Europą [96, 140].

Wartości udziału w zdolności do dyskryminacji wykazały brak haplotypów identycznych pod względem wszystkich loci Y-STR z wyjątkiem DYS388, DYS426 i DYS438 w co najmniej dwóch badanych populacjach, sugerując bardzo niską częstość mutacji w przypadku tych markerów. Inne prace wskazują na bardzo niską zmienność locus DYS392 w różnych haplogrupach [83] oraz dwumodalny rozkład częstości alleli DYS388, DYS392 i DYS438 w różnych populacjach, wynikający ze znacznego udziału w puli genowej populacji haplogrup o modalnych allelach rozdzielonych więcej niż jedną mutacją jednokrokową [60, 104]. Choć rozkładu dwumodalnego nie notowano w przypadku locus DYS426, przedstawione wyniki wskazują, że system ten jest w ogromnej większości dwualleliczny, gdyż zaledwie 0,35% badanych mężczyzn posiadało allele inne niż DYS426*11 i 12. Zjawisko to zauważyć można również w innych populacjach [22, 122], co potwierdza wyjątkowo niską częstość mutacji, a tym samym charakterystyczne dla haplogrup występowanie obu alleli DYS426.

Systemy DYS388, DYS392, DYS426 i DYS438 wydają się więc najlepsze w rozróżnianiu haplogrup i zostały użyte w pracy do oszacowania ich frekwencji w badanych populacjach metodą częstości alleli [12]. Mimo że częstości zbiorów modalnych dla haplogrup obliczone tą metodą są jedynie przybliżonymi częstościami właściwych haplogrup i obarczone są ryzykiem błędów spowodowanych mutacjami prowadzącymi do identyczności niespokrewnionych haplotypów, uzyskane częstości zbiorów modalnych dla haplogrup R1a, R1b i N3 w populacji polskiej były bardzo zbliżone do wartości uzyskanych w oparciu

o genotypowanie markerów binarnych [78, 158], zaś wszystkie obserwowane różnice były statystycznie nieistotne.

Analiza AMOVA ujawniła istotne różnice w rozkładzie haplotypów Y-STR między środkową Białorusią a jej częścią północną, która wydaje się regionem przejściowym dla osadnictwa słowiańskiego i bałtyckiego. Populacja białoruska dorzecza Dźwiny okazała się jedyną populacją słowiańską, która nie wykazała statystycznie istotnych wartości F_{ST} w porównaniu z innymi populacjami słowiańskimi oraz obiema populacjami bałtyckimi: litewską i łotewską. Wyjątkowość populacji północnobiałoruskiej najprawdopodobniej wynika z zaobserwowanego znacznego udziału chromosomów Y z haplogrupy N3, która osiąga wysoką częstość w populacjach bałtyckich i ugrofińskich [144, 183]. Obserwacja ta przeczy ogólnie przyjętej teorii etnogenezy Białorusinów autorstwa rosyjskiego archeologa Siedowa [86], zgodnie z którą formowanie się białoruskiego języka i narodowości następowało w wyniku slawizacji jednolitego substratu bałtyckiego na całym terytorium białoruskim. Wysoką częstość haplogrupy N3 wśród Słowian zaobserwowano również w wielu subpopulacjach rosyjskich, szczególnie w regionie Pskowa [93]. Jako że haplotypy Y-STR z haplogrupy N3 różnią się w populacjach bałtyckich i ugrofińskich najprawdopodobniej na skutek dwóch odrębnych fal migracji [74], pochodzenie haplotypów N3 w populacjach rosyjskich i północnobiałoruskiej może być różne. W przeciwieństwie do populacji ugrofińskich, w których wśród mężczyzn z haplogrupy N3 najczęściej występuje allel DYS19*14, w populacjach bałtyckich dominuje allel DYS19*15 [74]. Badania przeprowadzone w niniejszej pracy wykazały, że allel DYS19*15 był najczęstszy w zbiorze modalnym dla haplogrupy N3 w północnej Białorusi (66,7%), jak również w połączonych populacjach Białorusi (bez dorzecza Dźwiny), Polski i Słowacji (67,9%), co sugeruje, iż źródłem chromosomów Y z haplogrupy N3 w badanych populacjach jest ta sama fala migracji, która ukształtowała pulę genową przodków współczesnych Litwinów i Łotyszy.

Do analizy AMOVA w populacjach słowiańskich włączono również dwie izolowane populacje: autochtonicznych Białorusinów z Podlasia [114] oraz rosyjskich emigrantów (staroobrzędowców) przybyłych na ziemię północno-wschodniej Polski w XVIII wieku [113], za których ojczyznę na podstawie badań językowych przyjmuje się rejon Pskowa i Nowogrodu Wielkiego [184]. Mimo różnego pochodzenia obie grupy etniczne wykazały homogeniczność tylko w stosunku do jednej ze wszystkich porównywanych populacji. W przypadku Białorusinów z Podlasia nieistotną statystycznie wartość F_{ST} uzyskano w porównaniu z językowo i geograficznie najbliższą populacją środkowej Białorusi, zaś w przypadku polskich staroobrzędowców populacją taką była populacja rejonu Nowogrodu

Wielkiego, jedna z dwóch badanych subpopulacji rosyjskich. Jeśli przyjąć populacje wykazujące homogeniczność w stosunku do populacji izolowanych za ich populacje macierzyste, wyniki okazują się zgodne z oczekiwaniami.

Analiza AMOVA wykazała podobne wyodrębnienie populacji polskiej wśród innych grup słowiańskich, gdyż porównanie populacji polskiej w parach na poziomie istotności 0,05 nie wykazało statystycznie istotnej wartości F_{ST} tylko w stosunku do populacji ukraińskiej. Ponieważ sytuacja ta przypomina oba przypadki izolowanych populacji z północno-wschodniej Polski, możliwym wytłumaczeniem wyróżniających się cech populacji polskiej może być efekt dryfu genetycznego po migracji z ziem współczesnej Ukrainy, tym bardziej że populację polską cechuje jedna z najwyższych częstości haplogrupy R1a w porównaniu do innych populacji [115], zaś rozkład częstości haplogrup wyklucza znaczny udział chromosomów Y narodów niesłowiańskich (pochodzenia bałtyckiego, germańskiego lub semickiego), które współżyły z Polakami w przeszłości. Potwierdzeniem tego może być stosunkowo wysoka częstość alleli DYS19*17, DYS391*10, GATA H4.1*21 i DYS385*10,14 w zbiorze modalnym dla haplogrupy R1a w populacji polskiej oraz złożonego z tych alleli haplotypu, stwierzonego u 20,0% badanych Polaków ze zbioru modalnego dla haplogrupy R1a. Zaobserwowane podobieństwa między zbiorem modalnym dla haplogrupy R1a w populacji polskiej i słowackiej na przykładzie systemu DYS385 oraz stosunkowo wysoka częstość haplotypu DYS19*17-DYS391*10-GATA H4.1*21-DYS385*10,14 w zbiorze modalnym dla haplogrupy R1a w populacji słowackiej na poziomie 13,5%, którego występowanie na świecie, zbadane w oparciu o bazę danych YHRD (bez locus GATA H4.1), poza Ukrainą ograniczone jest praktycznie do środkowej części Europy, sugerują występowanie w populacjach zachodniosłowiańskich wynikającego z dryfu genetycznego efektu założyciela, czyli powstania populacji ze stosunkowo niewielkiej liczby osobników, których zmienność genetyczna jest jedynie fragmentem zmienności populacji macierzystej. Potwierdzeniem tego jest również stosunkowo wysoka częstość omawianego haplotypu w subpopulacjach niemieckich, sięgająca 4–5% w okolicach Drezna, Berlina i Rostocka, a więc na ziemiach zasiedlonych w średniowieczu przez Słowian, oraz jego szczególnie wysoka frekwencja w izolowanej zachodniosłowiańskiej populacji Łużyczan z południowo-wschodnich Niemiec (26,7%). Jednak w populacji słowackiej w analizie AMOVA wspomniany efekt założyciela nie był tak wyraźny jak w populacji polskiej, co wynikać może z zasiedlenia ziem słowackich przez dwie niezależne fale migracji Słowian, z których jedna w znacznie mniejszym stopniu objęła ziemie współczesnej Polski. Za dwiema falami migracji przemawia fakt, iż w populacji słowackiej wspomniany haplotyp

„zachodniosłowiański” DYS19*17-DYS391*10-GATA H4.1*21-DYS385*10,14 dzieli od dwóch najczęstszych haplotypów w zbiorze modalnym dla haplogrupy R1a co najmniej dwie jednokrokowe mutacje.

W rodzimym piśmiennictwie ukształtowały się dwie koncepcje pochodzenia terytorialnego (topogenezy) Słowian: koncepcja autochtonistyczna, zakładająca praojczyznę odrzańsko-wiślańską lub też odrzańsko-dnieprzańską, oraz koncepcja allochtonistyczna, wskazująca na wschodnią praojczyznę Słowian, przesuwaną się z biegiem czasu na zachód [106]. Najstarsze źródła historyczne kreślą granicę świata słowiańskiego dopiero w pierwszej połowie VI wieku [110], nie dając jednoznacznej odpowiedzi na pytanie o pochodzeniu Słowian. Badania językowe i archeologiczne dostarczają dowodów zarówno dla pierwszej, jak i dla drugiej z przedstawionych koncepcji [54, 94], przy czym teza o wschodniej praojczyźnie Słowian, przesuwaną się z biegiem czasu na zachód, zyskuje coraz większe uznanie [106].

Populacje ukraińska i południowobiałoruska wykazały wyjątkowo wysoką liczbę statystycznie nieistotnych wartości F_{ST} w porównaniu z innymi populacjami słowiańskimi (odpowiednio 8 i 7 takich wartości), co przy obserwacjach dotyczących populacji macierzystych dla Białorusinów i Rosjan zamieszkujących północno-wschodnią Polskę wskazuje na ziemie współczesnej Ukrainy i być może białoruskiego Polesia jako na obszar, z którego rozpoczęła się ekspansja Słowian w Europie. Wyniki te wraz z danymi sugerującymi efekt założyciela w populacji polskiej oraz wykluczającymi istotny udział plemion słowiańskich zamieszkujących ziemie obecnej Polski w kolonizacji Bałkanów, zdają się być argumentem przemawiającym na korzyść koncepcji allochtonistycznej, umiejscawiającej praojczyznę Słowian nad środkowym Dnieprem. Analiza zmienności mikrosatelitarnej w haplogrupie R1a we wszystkich populacjach słowiańskich oraz w populacjach sąsiednich z pewnością pomoże w weryfikacji tych hipotez.

Ważny, medyczno-sądowy aspekt polimorfizmu Y-STR nie budzi wątpliwości. W badaniach pokrewieństwa obliczenia ilorazu wiarygodności dla testowanych hipotez, w oparciu o który wydaje się opinie, opierają się na częstościach alleli obserwowanych w populacjach [24]. W przypadku zgodnych haplotypów chromosomu Y iloraz wiarygodności (przy pominięciu prawdopodobieństwa mutacji) liczony jest jako odwrotność tak obliczonej częstości [163]. Z powyższej zależności wynika, że dla rzadkich alleli wartość LR silnie zależy od wielkości bazy danych. W przypadku badanych haplotypów obejmujących 18 loci Y-STR w analizowanej grupie 208 mężczyzn z populacji polskiej praktycznie wszystkie haplotypy były rzadkie (aż 88% z nich obserwowano tylko raz).

Ponadto przy tak dużym zróżnicowaniu istnieje ogromne prawdopodobieństwo, że kolejny zbadany haplotyp nie wystąpi w utworzonej bazie danych. Stąd też maksymalna wartość LR dla przedstawionej w pracy bazy danych haplotypów Y-STR w naszej populacji wynosi 209.

Problem wielkości bazy danych w pewien sposób omija oszacowanie częstości oczekiwanej haplotypu Y-STR przy założeniu, że wszystkie rzadkie cechy w populacji występują równie rzadko [Charles H. Brenner, dane niepublikowane], która to wartość z uwagi na nieprawdziwość powyższego założenia nie jest zalecana w praktyce medyczo-sądowej. W przypadku badanych haplotypów Y-STR maksymalna wartość LR obliczona dla częstości oczekiwanej wyniosła aż 1632, co potwierdza wyjątkową przydatność badanego zestawu loci przy odpowiednio wysokiej liczbie zbadanych haplotypów.

Mimo stosunkowo niewielkiej bazy danych w stosunku do polimorfizmu, zaprezentowane w pracy ustalenie pokrewieństwa dwóch przyrodnych braci dowodzi przydatności opracowanej bazy danych w praktyce, gdyż zarówno dla haplotypów minimalnych w tej samej próbie populacyjnej, jak i dla bazy danych YHRD zawierającej haplotypy minimalne 1313 niespokrewnionych mężczyzn z populacji polskiej, wartość LR była kilkukrotnie mniejsza. Przypadek ten potwierdza również, że występują sprawy, w których analiza polimorfizmu chromosomu Y dostarcza zdecydowanie więcej informacji genetycznej niż analiza markerów autosomalnych.

Z uwagi na dziedziczenie nierekombinującej części chromosomu Y w ogromnej większości wraz z nazwiskiem, analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego tego chromosomu Y znalazła zastosowanie w badaniach genealogicznych [168]. Badania tego typu w ostatnim czasie intensywnie się rozwinęły, dając początek, jak niektórzy uważają, nowej dziedzinie nauki, zwanej genealogią genetyczną, antropogenealogią lub biogenealogią. Jedną ze stron internetowych poświęconych temu zagadnieniu w 2003 r. wymienia ponad 300 projektów genetyczno-genealogicznych, dotyczących populacji 7 regionów oraz 293 różnych nazwisk na świecie [118].

Przedstawiony w niniejszej pracy przypadek dotyczył mężczyzn noszących jednakowe lub zbliżone nazwiska, których pochodzenie ze wspólnej linii męskiej w wielu przypadkach potwierdzały badania genealogiczne [Andrzej Szarzyński, informacja ustna] i których pokrewieństwo dodatkowo zostało zweryfikowane analizą genetyczną polimorfizmu 18 loci Y-STR. W co najmniej w jednym przypadku, pomimo identycznego nazwiska i udowodnionego przy pomocy źródeł historycznych pochodzenia od wspólnego przodka w linii męskiej, pokrewieństwo zostało wykluczone badaniem genetycznym. Przeprowadzone badanie dostarczyło natomiast dodatkowego dowodu na pojawienie się w badanej linii

rodowej nowego nazwiska, utworzonego poprzez niewielką modyfikację nazwiska przodka, a tym samym na pochodzenie ze wspólnej linii męskiej mężczyzn noszących *de facto* różne nazwiska. Zgodnie ze stanem wiedzy autora przedstawiony w pracy przypadek jest pierwszym badaniem genetyczno-genealogicznym w Polsce.

W badaniach biogenealogicznych warta podkreślenia jest również korzyść z analizy większej liczby markerów Y-STR, gdyż przy pełnej zgodności haplotypów obliczenia wskazują na znacznie krótszy czas dzielący porównywanych mężczyzn od najbliższego wspólnego przodka (MRCA) [178], zaś przy jednakowym procentowym udziale niezgodności znacznie zawężony jest zakres czasu do MRCA w 95% przedziale ufności [77]. I tak oszacowana liczba pokoleń dzielących identyczne haplotypy oznaczone przy pomocy badanego oktadekapleksu jest dwukrotnie niższa od liczby pokoleń do MRCA w przypadku pełnej zgodności 9-lokusowego haplotypu minimalnego. Ponadto dwukrotnie węższy jest zakres czasu do MRCA w 95% przedziale ufności.

Wykazanie homogeniczności między dwiema populacjami pozwala na stworzenie wspólnej bazy danych, która eliminuje problem populacji o zróżnicowanym pochodzeniu etnicznym i przepływu genów między populacjami w szacowaniu częstości alleli w praktyce medyczno-sądowej. Ponadto wartość LR dla rzadkich haplotypów, a więc ogromnej większości haplotypów Y-STR w przedstawionej w pracy bazie danych, rośnie wraz z jej wielkością. Dlatego łączenie baz danych dla kilku populacji podnosi wartość LR dla rzadkich alleli, co jest tym bardziej istotne, że od wartości tej częstokroć zależy treść opinii wydanej na podstawie badań genetycznych w ekspertyzach sądowo-lekarskich. Próbkę haplotypów Y-STR z dwóch różnych populacji z dużym prawdopodobieństwem będą genetycznie nierozróżnialne, pozwalając na połączenie baz danych w celu szacowania częstości haplotypów, jeśli:

- udział poszczególnych haplogrup jest zbliżony w porównywanych populacjach,
- udział poszczególnych haplogrup jest różny, natomiast identyczne są w nich allele modalne i zbliżony jest wiek tychże haplogrup, co objawia się zbliżoną zmiennością loci, wynikającą z mutacji,
- nie obserwuje się wyraźnego efektu założyciela w jednej z populacji.

Wyniki niniejszej pracy wykazały, że wiele populacji słowiańskich spełnia powyższe kryteria.

Homogeniczność haplotypów minimalnych wśród Słowian rozciąga się od Alp aż po górną Wołgę bez względu na powiązania językowe, kulturowe i historyczne poszczególnych grup etnicznych. Przykład populacji słowackiej i białoruskiej pokazuje, że homogeniczność ta jest zachowana przy analizie haplotypów poszerzanych o kolejne loci.

Analiza haplotypów minimalnych wielu populacji europejskich, zdeponowanych w bazie danych YHRD, wykonana przez Roewera i wsp. [134] wykazała obecność trzech zbiorów populacji, które wykazują nieistotne różnice w obrębie jednego zbioru oraz istotne różnice między poszczególnymi zbiorami. Obserwacje te posłużyły do zdefiniowania metapopulacji, w obrębie których na podstawie programu uruchomionego w 2005 r. na stronie internetowej YHRD dokonywane są obliczenia częstości haplotypów, co znalazło się wśród najnowszych zaleceń ISFG dotyczących szacowania częstości haplotypów Y-STR w praktyce medyczno-sądowej [57]. Populacja polska wraz z pozostałymi populacjami północnej Słowiańszczyzny oraz populacjami bałtyckimi znalazła się w metapopulacji wschodnioeuropejskiej.

Wyniki niniejszej pracy wykazały jednak, że homogeniczność haplotypów Y-STR zaobserwowana w Polsce [117] nie rozciąga się poza granice polityczne państwa, gdyż populacja polska różni się od bliskich jej populacji słowackiej i białoruskiej nawet w rozkładzie częstości alleli pojedynczych systemów. Widoczne jest to chociażby na przykładzie markerów DYS19, DYS385, DYS390, DYS391 i DYS392, które stanowią część haplotypu minimalnego. Dlatego też w omawianym regionie wschodnioeuropejskim wyróżnić należy kilka metapopulacji, zaś w przypadku naszej populacji szacowanie częstości haplotypów powinno być ograniczone jedynie do obszaru Polski.

Poprzez selekcję markerów Y-STR wykazujących homogeniczność w obrębie badanych populacji możliwe okazało się stworzenie wspólnej bazy danych obejmującej zróżnicowane genetycznie populacje polską, słowacką i białoruską. Dla tak utworzonej bazy danych maksymalna wartość LR wynosi 569. Jednak eliminacja wielu markerów Y-STR, w tym kilku najbardziej polimorficznych, spowodowała znaczny spadek wartości zróżnicowania genetycznego i zdolności haplotypów do dyskryminacji, w związku z czym maksymalna wartość LR w praktyce będzie osiągana znacznie rzadziej. Mimo to z uwagi na imponującą liczbę dostępnych obecnie do badań mikrosatelitów chromosomu Y [77] w przyszłości może okazać się możliwa selekcja markerów do baz danych częstości haplotypów dla większych obszarów etnogeograficznych o sile dyskryminacji osiągającej poziom akceptowalny w praktyce medyczno-sądowej.

7. WNIOSKI

1. Optymalizacja warunków amplifikacji, rozdziału, detekcji i oznaczania alleli analizowanych 18 loci Y-STR pozwoliła na uzyskanie pewnych i powtarzalnych wyników genotypowania badanego multipleksu.
2. Rozkład haplotypów Y-STR w populacji polskiej wyróżnia ją nawet spośród blisko spokrewnionych populacji słowiańskich.
3. Selekcja markerów mikrosatelitarnych chromosomu Y, wykazujących homogeniczność między genetycznie odmiennymi populacjami, pozwala na tworzenie wspólnych baz danych haplotypów Y-STR dla większych regionów etnogeograficznych.
4. Rozmieszczenie haplotypów Y-STR w populacjach słowiańskich nie odzwierciedla ich wzajemnych relacji językowych, kulturowych i historycznych, wskazuje natomiast na ziemię nad środkowym Dnieprem jako obszar, z którego rozpoczęła się ekspansja Słowian w Europie.
5. Możliwość jednoczesnej analizy aż 18 systemów Y-STR, wysoka wartość siły dyskryminacji i szansy wykluczenia ojcostwa dla analizowanych haplotypów, wysoka czułość oraz wielokrotnie niższe koszty badania w stosunku do zestawów komercyjnych czynią badany oktadekopleks niezwykle przydatnym narzędziem w praktyce medycyny sądowej w ustalaniu pokrewieństwa i identyfikacji osobniczej, jak również w genealogii i badaniach filogenetycznych.

8. STRESZCZENIE

Unikalny sposób dziedziczenia oraz specyficzność w stosunku do materiału genetycznego pochodzącego od mężczyzn uczyniły markery mikrosatelitarne chromosomu Y niezwykle przydatnym narzędziem w genetyce sądowej. Celem przedstawionej pracy była analiza polimorfizmu 18 loci STR chromosomu Y metodą kompleksowej reakcji PCR i elektroforezy kapilarnej w trzech blisko spokrewnionych populacjach Europy Środkowo-Wschodniej: polskiej, słowackiej i białoruskiej, oraz oszacowanie ich przydatności w praktyce sądowo-lekarskiej.

W pierwszym etapie pracy stworzono układ kompleksowej reakcji PCR umożliwiających jednoczesną amplifikację badanych markerów i poddano go optymalizacji. Zaobserwowano, że na występowanie i ilość niespecyficznych produktów amplifikacji oraz artefaktów towarzyszących analizie sygnału fluorescencji istotnie wpływa ilość matrycowego DNA i polimerazy, stężenia starterów oraz czas i napięcie towarzyszące nastrzykowi elektrokinetycznemu poprzedzającemu elektroforezę, zaś modyfikacja jednego z tych parametrów pociąga za sobą konieczność optymalizacji pozostałych. Zaobserwowany brak wpływu objętości, w której przebiega reakcja, na wydajność amplifikacji pozwolił na jej znaczną redukcję.

Wykazano, że przy konstruowaniu multipleksów w celu amplifikacji mikrosatelitów o niepokrywających się zakresach wielkości alleli oprócz odpowiedniego zaprojektowania starterów niezwykle ważna jest empiryczna ocena ruchliwości amplifikowanych fragmentów. Zastosowane w pracy zoptymalizowane warunki amplifikacji i rozdziału elektroforetycznego pozwoliły na eliminację artefaktów i uzyskiwanie pewnych i powtarzalnych wyników. Badany multipleks charakteryzował się również wysoką czułością, jako że w standardowych warunkach możliwe było oznaczenie pełnego genotypu zaledwie przy 100 pg genomowego DNA mężczyzny.

W pracy zaprezentowano również metodę otrzymywania drabin alleli dla megapleksów poprzez oddzielną amplifikację każdego allelu i zagęszczanie przy użyciu filtracji odśrodkowej. Nazewnictwo systemów oraz alleli w drabinie oparto o najnowsze zalecenia Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej, co pozwala na porównywanie profili uzyskiwanych w różnych laboratoriach przy użyciu różnych zestawów do amplifikacji. Poprawność oznaczania alleli badanych loci potwierdziły identyczne wyniki genotypowania metodą elektroforezy poliakrylamidowej i barwienia srebrem oraz pozytywnie oceniony test

genotypowania markerów Y-STR, organizowany przez Instytut Medycyny Sądowej w Berlinie.

Wykazano, iż najbardziej polimorficznymi markerami Y-STR w badanych populacjach były systemy DYS385 i DYS389. Najbardziej wartościowym systemem w rozróżnianiu podobnych haplotypów okazał się system DYS389, podczas gdy loci DYS426 i DYS438 nie miały jakiegokolwiek wpływu na zdolność multipleksu do dyskryminacji. Wśród 568 niespokrewnionych mężczyzn z populacji polskiej, słowackiej i białoruskiej wykazano 500 różnych haplotypów, spośród których 458 obserwowano tylko jeden raz. Wartość siły dyskryminacji oraz szansy wykluczenia mężczyzny niesłusznie pozwanego o ojcostwo przekraczała 0,998 we wszystkich trzech populacjach. W porównaniu do standardowo badanego zestawu 9 loci Y-STR, zwanego haplotypem minimalnym, udział haplotypów obserwowanych tylko raz wzrósł z 51% do 81%.

Analiza wariancji molekularnej AMOVA ujawniła istotne różnice pomiędzy populacjami ($P = 0,0004$) i wykluczyła możliwość stworzenia jednej wspólnej bazy danych haplotypów Y-STR. Charakterystyczna dla populacji polskiej homogeniczność haplotypów Y-STR nie przekraczała granic politycznych państwa, natomiast populacje Słowacji oraz południowej i środkowej Białorusi były genetycznie nierozróżnialne, umożliwiając stworzenie wspólnej bazy danych haplotypów Y-STR dla wszystkich 18 loci. Dopiero identyfikacja i selekcja markerów wykazujących homogeniczność w obrębie populacji polskiej, słowackiej i białoruskiej umożliwiła stworzenie wspólnej bazy danych haplotypów Y-STR o zróżnicowaniu genetycznym równym 0,95 i zdolności do dyskryminacji równej 26%. Porównanie haplotypów minimalnych w wielu populacjach słowiańskich wykazało, że homogeniczność haplotypów minimalnych wśród Słowian rozciąga się od Alp aż po górną Wołgę bez względu na powiązania językowe, kulturowe i historyczne poszczególnych grup etnicznych, natomiast centralna pozycja populacji ukraińskiej w sieci statystycznie nieistotnych wartości statystyki F, obliczonych metodą AMOVA, przemawia za umiejscowieniem praojczyzny Słowian nad środkowym Dnieprem.

W pracy zaprezentowano możliwość praktycznego wykorzystania badanego układu kompleksowej reakcji PCR w ekspertyzach sądowych w przypadkach dochodzenia pokrewieństwa w linii męskiej, w których analiza markerów autosomalnych jest niewystarczająca do wydania rozstrzygającej opinii. Opisany został również pierwszy w Polsce przypadek wykorzystania analizy polimorfizmu chromosomu Y w badaniu genealogicznym mężczyzn wywodzących się ze wspólnej linii męskiej, których drzewa rodowe rozeszły się przed kilkoma wiekami.

Ze względu na możliwość jednoczesnej analizy aż 18 systemów Y-STR, wysoką wartość siły dyskryminacji i szansy wykluczenia ojcostwa dla analizowanych haplotypów, wysoką czułość oraz wielokrotnie niższe koszty badania w stosunku do zestawów komercyjnych, badany multipleks stanowi niezwykle przydatne narzędzie w genealogii i badaniach historii populacji, a przede wszystkim w praktyce medyczno-sądowej w dochodzeniu pokrewieństwa i identyfikacji osobniczej.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Akane A., Shiono H., Matsubara K., Nakahori Y., Seki S., Nagafuchi S., Yamada M., Nakagome Y. (1991) Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction (PCR): two alternative methods. *Forensic Sci. Int.* 49: 81–88.
2. Allen R.C., Graves G., Budowle B. (1989) Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver. *Biotechniques* 7: 736–744.
3. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403–410.
4. Alves C., Amorim A., Gusmão L., Pereira L. (2001) VWA STR genotyping: further inconsistencies between Perkin-Elmer and Promega kits. *Int. J. Legal Med.* 115: 97–99.
5. Applied Biosystems (2000) ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits. Original and version 2.0. Protocol. Foster City, California.
6. Applied Biosystems (2000) GeneScan Reference Guide. Chemistry Reference for the ABI Prism 310 Genetic Analyzer. Foster City, California.
7. Applied Biosystems (2001) ABI Prism 310 Genetic Analyzer. User Guide. Foster City, California.
8. Applied Biosystems (2001) ABI Prism BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit. Protocol. Foster City, California.
9. Applied Biosystems (2001) AmpFISTR Profiler Plus ID PCR Amplification Kit. User Bulletin. Foster City, California.
10. Applied Biosystems (2001) POP-4 polymer sequencing protocols for the 310 Genetic Analyzer. ABI Prism 310 Genetic Analyzer. User Bulletin. Foster City, California.
11. Applied Biosystems (2004) AmpFISTR Yfiler. PCR Amplification Kit. User's Manual. Foster City, California.
12. Athey T.W. (2005) Haplogroup prediction from Y-STR values using an allele-frequency approach. *J. Genet. Geneal.* 1: 1–7.
13. Bacher J.W., Flanagan L.A., Smalley R.L., Nassif N.A., Burgart L.J., Halberg R.B., Megid W.M.A., Thibodeau S.N. (2004) Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors. *Dis. Markers* 20: 237–250.
14. Ballard D.J., Phillips C., Wright G., Thacker C.R., Robson C., Revoir A.P., Syndercombe Court D. (2005) A study of mutation rates and the characterisation of intermediate, null and duplicated alleles for 13 Y chromosome STRs. *Forensic Sci. Int.* 155: 65–70.
15. Bao W., Zhu S., Pandya A., Zerjal T., Xu J., Shu Q., Du R., Yang H., Tyler-Smith C. (2000) MSY2: a slowly evolving minisatellite on the human Y chromosome which provides a useful polymorphic marker in Chinese populations. *Gene* 244: 29–33.
16. Bär W., Brinkmann B., Budowle B., Carracedo A., Gill P., Lincoln P., Mayr W., Olaisen B. (1997) DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. 110: 175–176.
17. Barac L., Perić M., Klarić I.M., Rootsi S., Janičević B., Kivisild T., Parik J., Rudan I., Villems R., Rudan P. (2003) Y chromosomal heritage of Croatian population and its island isolates. *Eur. J. Hum. Genet.* 11: 535–542.
18. Bassam B.J., Caetano-Anolles G., Gresshoff P.M. (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196: 80–83.
19. Belezá S., Alves C., González-Neira A., Lareu M., Amorim A., Carracedo A., Gusmão L. (2003) Extending STR markers in Y chromosome haplotypes. *Int. J. Legal Med.* 117: 27–33.
20. Berent J. (2003) Biostatystyczna interpretacja badań genetycznych w dochodzeniu ojcostwa dla przypadków bliskiego pokrewieństwa pozwanego mężczyzny i ojca biologicznego. Rozprawa habilitacyjna. Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź.
21. Berger B., Niederstätter H., Brandstätter A., Parson W. (2003) Molecular characterization and Austrian Caucasian population data of the multi-copy Y-chromosomal STR DYS464. *Forensic Sci. Int.* 137: 221–230.

22. Biondo R., Caglià A., Asili P., D'Agostaro G., D'Agostino G., Spinella A. (2004) Typing of 20 Y-chromosome STRs in the Italian population. *Forensic Sci. Int.* 146S: S135–S138.
23. Bosch E., Lee A.C., Calafell F., Arroyo E., Henneman P., de Knijff P., Jobling M.A. (2002) High resolution Y chromosome typing: 19 STRs amplified in three multiplex reactions. *Forensic Sci. Int.* 125: 42–51.
24. Brenner C.H. (2005) *DNA-VIEW 27.27*. Oakland, California.
25. Brownstein M., Carpten J., Smith J. (1996) Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques* 20: 1004–1010.
26. Budowle B. (2000) STR allele concordance between different primer sets – a brief summary. *Profiles DNA* 3(3): 10–11.
27. Budowle B., Masibay A., Anderson S.J., Barna C., Biega L., Brenneke S., Brown B.L., Cramer J., DeGroot G.A., Douglas D., Duceman B., Eastman A., Giles R., Hamill J., Haase D.J., Janssen D.W., Kupferschmid T.D., Lawton T., Lemire C., Llewellyn B., Moretti T., Neves J., Palaski C., Schueler S., Sgueglia J., Sprecher C., Tomsey C., Yet D. (2001) STR primer concordance study. *Forensic Sci. Int.* 124: 47–54.
28. Butler J.M. (2001) *Forensic DNA typing*. Academic Press, London, San Diego.
29. Butler J.M. (2003) Recent developments in Y-short tandem repeat and Y-single nucleotide polymorphism analysis. *Forensic Sci. Rev.* 15: 91–111.
30. Butler J.M., Buel E., Crivellente F., McCord B.R. (2004) Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis* 25: 1397–1412.
31. Butler J.M., Li J., Monforte J.A., Becker C.H., Lee S. (1998) Rapid and automated analysis of short tandem repeat loci using time-of-flight mass spectrometry. *Proceedings of the Eight International Symposium on Human Identification 1997*, Promega Corporation: 94–101.
32. Butler J.M., McCord B.R., Jung J.M., Allen R.O. (1994) Rapid analysis of the short tandem repeat HUMTH01 by capillary electrophoresis. *Biotechniques* 17: 1062–1070.
33. Butler J.M., Ruitberg C.M., Vallone P.M. (2001) Capillary electrophoresis as a tool for optimization of multiplex PCR reactions. *Fresenius J. Anal. Chem.* 369: 200–205.
34. Butler J.M., Schoske R. (2004) Duplication of DYS19 flanking regions in other parts of the Y chromosome. *Int. J. Legal Med.* 118: 178–183.
35. Butler J.M., Schoske R., Vallone P.M., Kline M.C., Redd A.J., Hammer M.F. (2002) A novel multiplex for simultaneous amplification of 20 Y chromosome STR markers. *Forensic Sci. Int.* 129: 10–24.
36. Butler J.M., Shen Y., McCord B.R. (2003) The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J. Forensic Sci.* 48: 1054–1064.
37. Caglià A., Dobosz M., Boschi L., d'Aloja E., Pascali V.L. (1998) Increased forensic efficiency of a STR-based Y-specific haplotype by addition of the highly polymorphic DYS385 locus. *Int. J. Legal. Med.* 111: 142–146.
38. Callinan P.A., Hedges D.J., Salem A-H., Xing J., Walker J.A., Garber R.K., Watkins W.S., Bamshad M.J., Jorde L.B., Batzer M.A. (2003) Comprehensive analysis of Alu-associated diversity on the human sex chromosomes. *Gene* 317: 103–110.
39. Cavalli-Sforza L.L., Cavalli-Sforza F. (1995) *The great human diasporas. The history of diversity and evolution*. Perseus Books Publishing, Cambridge, Massachusetts.
40. Chamberlain J.S., Gibbs R.A., Ranier J.E., Nguyen P.N., Caskey C.T. (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16: 11141–11156.
41. Chou Q., Russell M., Birch D.E., Raymond J., Bloch W. (1992) Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res.* 20: 1717–1723.
42. Clark J.M. (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16: 9677–9686.
43. Crouse C.A., Rogers S., Amriott E., Gibson S., Masibay A. (1999) Analysis and interpretation of short tandem repeat microvariants and three-banded allele patterns using multiple allele detection systems. *J. Forensic Sci.* 44: 87–94.

44. Dalewska-Greń H. (1997) *Języki słowiańskie*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
45. Dettlaff-Kąkol A., Pawłowski R. (2002) First Polish DNA “manhunt” – an application of Y-chromosome STRs. *Int. J. Legal Med.* 116: 289–291.
46. Devaney J.M., Girard J.E., Marino M.A. (2000) DNA microsatellite analysis using ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* 72: 858–864.
47. Dupuy B.M., Gedde-Dahl T. Jr., Olaisen B. (2000) DXYS267: DYS393 and its X chromosome counterpart. *Forensic Sci. Int.* 112: 111–121.
48. Edman C.F., Raymond D.E., Wu D.J., Tu E., Sosnowski R.G., Butler W.F., Nerenberg M., Heller M.J. (1997) Electric field directed nucleic acid hybridization on microchips. *Nucleic Acids Res.* 25: 4907–4914.
49. Edwards A., Civitello A., Hammond H.A., Caskey C.T. (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 746–756.
50. Friedman J.M., McGillivray B.C. (1997) *Polimorfizm genetyczny*. W: Friedman J.M., Dill F.J., Hayden M.R., McGillivray B.C., *Genetyka*: 81–89. Urban & Partner, Wrocław.
51. Gill P., Brenner C., Brinkmann B., Budowle B., Carracedo A., Jobling M.A., de Knijff P., Kayser M., Krawczak M., Mayr W.R., Morling N., Olaisen B., Pascali V., Prinz M., Roewer L., Schneider P.M., Sajantila A., Tyler-Smith C. (2001) DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs. *Int. J. Legal Med.* 114: 305–309.
52. Ginot F., Bordelais I., Nguyen S., Gyapay G. (1996) Correction of some genotyping errors in automated fluorescent microsatellite analysis by enzymatic removal of one base overhangs. *Nucleic Acids Res.* 21: 540–541.
53. Główny Urząd Statystyczny (2003) *Raport z wyników Narodowego Spisu Powszechnego Ludności i Mieszkań 2002*. GUS, Warszawa.
54. Gołąb Z. (2004) *O pochodzeniu Słowian w świetle faktów językowych*. Towarzystwo Autorów i Wydawców Prac Naukowych Universitas, Kraków.
55. González-Neira A., Elmoznino M., Lareu M.V., Sánchez-Diz P., Gusmão L., Prinz M., Carracedo A. (2001) Sequence structure of 12 novel Y chromosome microsatellites and PCR amplification strategies. *Forensic Sci. Int.* 19–26.
56. Gusmão L., Alves C., Beleza S., Amorim A. (2002) Forensic evaluation and population data on the new Y-STRs DYS434, DYS437, DYS438, DYS439 and GATA A10. *Int. J. Legal Med.* 116: 139–147.
57. Gusmão L., Butler J.M., Carracedo A., Gill P., Kayser M., Mayr W.R., Morling N., Prinz M., Roewer L., Tyler-Smith C., Schneider P.M. (2005) DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *Int. J. Legal Med.*, w druku (DOI 10.1007/s00414-005-0026-1).
58. Gusmão L., González-Neira A., Alves C., Lareu M., Costa S., Amorim A., Carracedo A. (2002) Chimpanzee homologous of human Y specific STRs. A comparative study and a proposal for nomenclature. *Forensic Sci. Int.* 126: 129–136.
59. Gusmão L., González-Neira A., Pestoni C., Brión M., Lareu M.V., Carracedo A. (1999) Robustness of the Y STRs DYS19, DYS389 I and II, DYS390 and DYS393: optimization of a PCR pentaplex. *Forensic Sci. Int.* 106: 163–172.
60. Gusmão L., Krawczak M., Sánchez-Diz P., Alves C., Lopes A., Beleza S., Carracedo A., Amorim A. (2003) Bimodal allele frequency distribution at Y-STR loci DYS392 and DYS438: no evidence for a deviation from the stepwise mutation model. *Int. J. Legal Med.* 117: 287–290.
61. Gusmão L., Sánchez-Diz P., Alves C., Quintáns B., García-Poveda E., Geada H., Raimondi E., Silva de la Fuente S.M., Vide M.C., Whittle M.R., Zarrabeitia M.T., Carvalho M., Negreiros V., Solla L.P., Riancho J.A., Campos-Sánchez R., Vieira-Silva C., Toscanini U., Amorim A., Carracedo A. (2003) Results of the GEP-ISFG collaborative study on the Y chromosome STRs GATA A10, GATA C4, GATA H4, DYS437, DYS438, DYS439, DYS460 and DYS461: population data. *Forensic Sci. Int.* 135: 150–157.
62. Gusmão L., Sánchez-Diz P., Calafell F., Martín P., Alonso C.A., Álvarez-Fernández F., Alves C., Borjas-Fajardo L., Bozzo W.R., Bravo M.L., Builes J.J., Capilla J., Carvalho M., Castillo C., Catanesi C.I., Corach D., Di Lonardo A.M., Espinheira R., Fagundes de Carvalho E., Farfán M.J., Figueiredo H.P., Gomes I., Lojo M.M., Marino M., Pinheiro M.F., Pontes M.L., Prieto V.,

- Ramos-Luis E., Riancho J.A., Souza Góes A.C., Santapa O.A., Sumita D.R., Vallejo G., Vidal Rioja L., Vide M.C., Vieira da Silva C.I., Whittle M.R., Zabala W., Zarrabeitia M.T., Alonso A., Carracedo A., Amorim A. (2005) Mutation rates at Y chromosome specific microsatellites. *Hum. Mutat.* 26: 520–528.
63. Haas H., Budowle B., Weiler G. (1994) Horizontal polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Electrophoresis* 15: 153–158.
 64. Hahner S., Schneider A., Ingendoh A., Mosner J. (2000) Analysis of short tandem repeat polymorphisms by electrospray ion trap mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* 28: e82.
 65. Hammer M., Walsh B., Schurr T.G., Redd A.J., Darvasi A., Behar D., Rothschild M.F., Kaplan M., Greenspan B., Blankfeld M. (2001–2003) Family Tree DNA – Genealogy by Genetics. <http://www.familytreedna.com/dna101.html>; data dostępu: 01.02.2006 r.
 66. Hanson E.K., Ballantyne J. (2004) A highly discriminating 21 locus Y-STR “megaplex” system designed to augment the minimal haplotype loci for forensic casework. *J. Forensic Sci.* 49: 40–51.
 67. Haque K.A., Pfeiffer R.M., Beerman M.B., Struewing J.P., Chanock S.J., Bergen A.W. (2003) Performance of high-throughput DNA quantification methods. *BMC Biotechnology* 3: 20.
 68. Heyer E., Puymirat J., Dieltjes P., Bakker E., de Knijff P. (1997) Estimating Y chromosome specific microsatellite mutation frequencies using deep rooting pedigrees. *Hum. Mol. Genet.* 6: 799–803.
 69. International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921.
 70. Jobling M.A. (2001) Y-chromosomal SNP haplotype diversity in forensic analysis. *Forensic Sci. Int.* 118: 158–162.
 71. Jobling M.A., Pandya A., Tyler-Smith C. (1997) The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int. J. Legal Med.* 110: 118–124.
 72. Jobling M.A., Tyler-Smith C. (1995) Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. *Trends Genet.* 11: 449–456.
 73. Jobling M.A., Tyler-Smith C. (2003) The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat. Rev. Genet.* 4: 598–612.
 74. Kasperavičiūtė D., Kučinskas V., Stoneking M. (2004) Y chromosome and mitochondrial DNA variation in Lithuanians. *Ann. Hum. Genet.* 68: 438–452.
 75. Kayser M., Brauer S., Willuweit S., Schädlich H., Batzer M.A., Zawacki J., Prinz M., Roewer L., Stoneking M. (2002) Online Y-chromosomal short tandem repeat haplotype reference database (YHRD) for U.S. populations. *J. Forensic Sci.* 47: 513–519.
 76. Kayser M., Caglià A., Corach D., Fretwell N., Gehrig C., Graziosi G., Heidorn F., Herrmann S., Herzog B., Hidding M., Honda K., Jobling M., Krawczak M., Leim K., Meuser S., Meyer E., Oesterreich W., Pandya A., Parson W., Penacino G., Perez-Lezaun A., Piccinini A., Prinz M., Schmitt C., Schneider P.M., Szibor R., Teifel-Greding J., Weichhold G., de Knijff P., Roewer L. (1997) Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *Int. J. Legal Med.* 110: 125–133: 141–149.
 77. Kayser M., Kittler R., Erler A., Hedman M., Lee A.C., Mohyuddin A., Mehdi S.Q., Rosser Z., Stoneking M., Jobling M.A., Sajantila A., Tyler-Smith C. (2004) A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellites. *Am. J. Hum. Genet.* 74: 1183–1197.
 78. Kayser M., Lao O., Anslinger K., Augustin C., Bargel G., Edelmann J., Elias S., Heinrich M., Henke J., Henke L., Hohoff C., Illing A., Jonkisz A., Kuźniar 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., Woźniak M., Żołądzewska M., Roewer L., Dobosz T., Płoski R. (2005) Significant genetic differentiation between Poland and Germany follows present-day political borders, as revealed by Y-chromosome analysis. *Hum. Genet.* 117: 428–443.
 79. Kayser M., Roewer L., Hedman M., Henke L., Henke J., Brauer S., Krüger C., Krawczak M., Nagy M., Dobosz T., Szibor R., de Knijff P., Stoneking M., Sajantila A. (2000) Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 1580–1588.

80. Kayser M., Sajantila A. (2001) Mutations at Y-STR loci: implications for paternity testing and forensic analysis. *Forensic Sci. Int.* 118: 116–121.
81. Kebelmann-Betzing C., Seeger K., Dragon S., Schmitt G., Moricke A., Schild T.A., Henze G., Beyermann B. (1998) Advantages of a new Taq DNA polymerase in multiplex PCR and time-release PCR. *Biotechniques* 24: 154–158.
82. Kellogg D.E., Rybalkin I., Chen S., Mukhamedova N., Vlasik T., Siebert P.D., Chenchik A. (1994) TaqStart Antibody: “hot start” PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques* 16: 1134–1137.
83. Kittler R., Erler A., Brauer S., Stoneking M., Kayser M. (2003) Apparent intrachromosomal exchange on the human Y chromosome explained by population history. *Eur. J. Hum. Genet.* 11: 304–314.
84. Klein S.B., Wallin J.M., Buoncristiani M.R. (2003) Addressing ambient temperature variation effects on sizing precision of AmpFISTR Profiler Plus alleles detected on the ABI Prism 310 Genetic Analyzer. *Forensic Sci. Commun.* 5(1).
85. Klintschar M., Wiegand P. (2003) Polymerase slippage in relation to the uniformity of tetrameric repeat stretches. *Forensic Sci. Int.* 135: 163–166.
86. Krawcewicz A. (2001) Białoruś – Wielkie Księstwo Litewskie. Państwo i stosunki etniczne. *Białorus. Zesz. Hist.* 16.
87. Kur J. (1994) Podstawy inżynierii genetycznej. Teoria, ćwiczenia, testy. Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk.
88. Lahiri D.K., Nurnberger J.I. Jr. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 19: 5444.
89. Lauc L.B., Peričić M., Klarić I.M., Šijački A., Popović D., Janićijević B., Rudan P. (2005) Y chromosome STR polymorphisms in a Serbian population sample. *Forensic Sci. Int.* 150: 97–101.
90. Leclair B., Sgueglia J.B., Wojtowicz P.C., Juston A.C., Fregeau C.J., Fourny R.M. (2003) STR DNA typing: increased sensitivity and efficient sample consumption using reduced PCR reaction volumes. *J. Forensic Sci.* 48: 1001–1013.
91. Lessig R., Willuweit S., Krawczak M., Wu F.C., Pu C.E., Kim W., Henke L., Henke J., Miranda J., Hidding M., Benecke M., Schmitt C., Magno M., Calacal G., Delfin F.C., de Ungria M.C.A., Elias S., Augustin C., Tun Z., Honda K., Keyser C., Ludes B., Klintschar M., Immel U.D., Reichenpfaeder B., Zaharova B., Roewer L. (2003) Asian online Y-STR Haplotype Reference Database. *Leg. Med. (Tokio)* 5: S160–S163.
92. Magnuson V., Ally D., Nylund S., Karanjawala Z., Rayman J., Knapp J., Lowe A., Ghosh S., Collins F. (1996) Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by Taq DNA polymerase: implications for PCR-based genotyping and cloning. *Biotechniques* 21: 700–709.
93. Malyarchuk B., Derenko M., Grzybowski T., Lunkina A., Czarny J., Rychkov S., Morozova I., Denisova G., Miściska-Śliwka D. (2004) Differentiation of mitochondrial DNA and Y chromosomes in Russian populations. *Hum. Biol.* 76: 877–900.
94. Mańczak W., red. (2001) *Praojczyzna Słowian, Zbiór wypowiedzi.* Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków.
95. Marjanovic D., Bakal N., Pojskic N., Kapur L., Drobnic K., Primorac D., Bajrovic K., Hadziselimovic R. (2005) Population data for the twelve Y-chromosome short tandem repeat loci from the sample of multinational population in Bosnia and Herzegovina. *J. Forensic Sci.* 50: 223–225.
96. Marjanovic D., Fornarino S., Montagna S., Primorac D., Hadziselimovic R., Vidovic S., Pojskic N., Battaglia V., Achilli A., Drobnic K., Andjelinovic S., Torroni A., Santachiara-Benerecetti A.S., Semino O. (2005) The peopling of modern Bosnia-Herzegovina: Y-chromosome haplogroups in the three main ethnic groups. *Ann. Hum. Genet.* 69: 757–763.
97. McCord B.R., Jung J.M., Holleran E.A. (1993) High resolution capillary electrophoresis of forensic DNA using a non-gel sieving buffer. *J. Liq. Chromatogr.* 16: 1963–1981.
98. Meng C.Y., Both K., Burgoyne L.A. (2003) Casework: a Y-STR triplex for use after autosomal multiplexes. *Forensic Sci. Commun.* 5(2).

99. Meyer E., Wiegand P., Brinkmann B. (1995) Phenotype differences of STRs in 7 human populations. *Int. J. Legal Med.* 107: 314–322.
100. Mohyuddin A., Ayub Q., Kumar R., Zerjal T., Helgason A., Mehdi S.Q., Tyler-Smith C. (2001) Y-chromosomal STR haplotypes in Pakistani populations. *Forensic Sci. Int.* 118: 141–146.
101. Moretti T., Koons B., Budowle B. (1998) Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase. *Biotechniques* 25: 716–722.
102. Murray V., Monchawin C., England P.R. (1993) The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR. *Nucleic Acids Res.* 21: 2395–2398.
103. Nachman M.W., Crowell S.L. (2000) Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics* 156: 297–304.
104. Nebel A., Filon D., Hohoff C., Faerman M., Brinkmann B., Oppenheim A. (2001) Haplogroup-specific deviation from the stepwise mutation model at the microsatellite loci DYS388 and DYS392. *Eur. J. Hum. Genet.* 9: 22–26.
105. Niederstätter H., Berger B., Oberacher H., Brandstätter A., Huber C.G., Parson W. (2004) Separate analysis of DYS385a and b versus conventional DYS385 typing: is there forensic relevance? *Int. J. Legal Med.* 119: 1–9.
106. Nowa Encyklopedia Powszechna PWN (1998) Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
107. Nuovo G.J., Gallery F., MacConnell P., Becker J., Bloch W. (1991) An improved technique for the in situ detection of DNA after polymerase chain reaction amplification. *Am. J. Pathol.* 139: 1239–1244.
108. Olszewski M., Rębała K., Szczerkowska Z., Kur J. (2005) Application of SSB-like protein from *Thermus aquaticus* in multiplex PCR of human Y-STR markers identification. *Mol. Cell. Probes* 19: 203–205.
109. Ott J. (2001) Utility Programs for Analysis of Genetic Linkage. Laboratory of Statistical Genetics, Rockefeller University, New York.
110. Parczewski M. (2002) Praojczyzna Słowian w ujęciu źródłoznawczym. W: Kokowski A. (red.), Cień Światowita czyli pięć głosów w sprawie etnogenezy Słowian: 23–68. Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin.
111. Pascali V.L., Dobosz M., Brinkmann B. (1998) Coordinating Y-chromosomal STR research for the Courts. *Int. J. Legal Med.* 112: 1.
112. Pawłowski R. (1993) Zastosowanie reakcji łańcuchowej polimerazy DNA (metoda PCR) do ustalania płci osobnika na podstawie badania DNA izolowanego ze śladów biologicznych. Rozprawa habilitacyjna. Akademia Medyczna w Gdańsku, Gdańsk.
113. Pepiński W., Niemcunowicz-Janica A., Skawrońska M., Koc-Żórawska E., Janica J., Sołtyszewski I. (2004) Y-chromosome STR haplotypes and alleles in the population sample of Old Believers residing in the Northeastern Poland. *Forensic Sci. Int.* 143: 65–68.
114. Pepiński W., Niemcunowicz-Janica A., Skawrońska M., Koc-Żórawska E., Janica J., Sołtyszewski I. (2004) Y-chromosome STR haplotypes in a population sample of the Byelorussian minority living in the northeastern Poland. *Forensic Sci. Int.* 140: 117–121.
115. Peričić M., Lauc L.B., Klarić I.M., Rootsi S., Janićijević B., Rudan I., Terzić R., Čolak I., Kvesić A., Popović D., Šijački A., Behluli I., Đorđević D., Efremovska L., Bajec Đ.D., Stefanović B.D., VILLEMS R., Rudan P. (2005) High-resolution phylogenetic analysis of southeastern Europe traces major episodes of paternal gene flow among Slavic populations. *Mol. Biol. Evol.* 22: 1964–1975.
116. Perkin-Elmer Corporation (1993) AmpliType User Guide. Version 2. Norwalk, Connecticut.
117. Płoski R., Woźniak M., Pawłowki R., Monies D.M., Branicki W., Kupiec T., Kloosterman A., Dobosz T., Bosch E., Nowak M., Lessig R., Jobling M.A., Roewer L., Kayser M. (2002) Homogeneity and distinctiveness of Polish paternal lineages revealed by Y chromosome microsatellite haplotype analysis. *Hum. Genet.* 110: 592–600.
118. Pomery C. (2003) Chris Pomery's DNA Portal. <http://freepages.genealogy.rootsweb.com/~allpoms/genetics1a.html>; data publikacji: 30.06.2001 r.; data aktualizacji: 10.01.2003 r.; data dostępu: 01.02.2005 r.
119. Prinz M., Boll K., Baum H., Shaler B. (1997) Multiplexing of Y chromosome specific STRs and performance for mixed samples. *Forensic Sci. Int.* 85: 209–218.

120. Promega Corporation (2001) GenePrint STR Systems (Silver Stain Detection). Technical Manual. Madison, Wisconsin.
121. Promega Corporation (2003) PowerPlex Y System. Technical Manual. Madison, Wisconsin.
122. Quintana-Murci L., Bigham A., Rouba H., Barakat A., McElreavey K., Hammer M. (2004) Y-chromosomal STR haplotypes in Berber and Arabic-speaking populations from Morocco. *Forensic Sci. Int.* 140: 113–115.
123. Quintana-Murci L., Krausz C., McElreavey K. (2001) The human Y chromosome: function, evolution and disease. *Forensic Sci. Int.* 118: 169–181.
124. 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. (1999) Y-chromosome specific YCAII, DYS19 and YAP polymorphisms in human populations: a comparative study. *Ann. Hum. Genet.* 63: 153–166.
125. Radtkey R., Feng L., Muralhidar M., Duhon M., Canter D., DiPierro D., Fallon S., Tu E., McElfresh K., Nerenberg N., Sosnowski R. (2000) Rapid, high fidelity analysis of simple sequence repeats on an electronically active DNA microchip. *Nucleic Acids Res.* 28: e17.
126. Raszeja S. (1970) Współczesne problemy nauki o grupach krwi. W: *Alma Mater Posnaniensis*: 49–62. Polskie Towarzystwo Pediatryczne, Bydgoszcz.
127. Redd A.J., Agellon A.B., Kearney V.A., Contreras V.A., Karafet T., Park H., de Knijff P., Butler J.M., Hammer M.F. (2002) Forensic value of 14 novel STRs on the human Y chromosome. *Forensic Sci. Int.* 130: 97–111.
128. Reliagene Technologies (2003) Y-PLEX 12. Instruction Manual v1. New Orleans, Louisiana.
129. Rębała K., Kapińska E., Szczerkowska Z. (2003) Analysis of polymorphism of three human Y-chromosome STR loci: DYS390, DYS392 and DYS393 in the population of northern Poland. *J. Appl. Genet.* 44: 219–223.
130. Rębała K., Szczerkowska Z. (2004) Identyfikacja bardzo krótkiego allela YCAII w populacji północnej Polski. *Arch. Med. Sądowej Kryminol.* 54: 17–24.
131. Rębała K., Szczerkowska Z. (2005) Polish population study on Y chromosome haplotypes defined by 18 STR loci. *Int. J. Legal Med.* 119: 303–305.
132. Rodríguez S., Zapata C. (2002) Typing dinucleotide repeats under nondenaturing conditions with single-base resolution and high sizing precision. *Mol. Biotechnol.* 21: 117–122.
133. Roewer L., Arnemann J., Spurr N.K., Grzeschik K.H., Epplen J.T. (1992) Simple repeat sequences on the human Y chromosome are equally polymorphic as their autosomal counterparts. *Hum. Genet.* 89: 389–394.
134. Roewer L., Croucher P.J.P., Willuweit S., Lu T.T., Kayser M., Lessig R., de Knijff P., Jobling M.A., Tyler-Smith C., Krawczak M. (2005) Signature of recent historical events in the European Y-chromosomal STR haplotype distribution. *Hum. Genet.* 116: 279–291.
135. Roewer L., Kayser M., de Knijff P., Anslinger K., Betz A., Caglià A., Corach D., Füredi S., Henke L., Hidding M., Kärger H.J., Lessig R., Nagy M., Pascali V.L., Parson W., Rolf B., Schmitt C., Szibor R., Teifel-Greding J., Krawczak M. (2000) A new method for the evaluation of matches in non-recombining genomes: application to Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes in European males. *Forensic Sci. Int.* 114: 31–43.
136. Roewer L., Kayser M., Dieltjes P., Nagy M., Bakker E., Krawczak M., de Knijff P. (1996) Analysis of molecular variance (AMOVA) of Y-chromosome-specific microsatellites in two closely related human populations. *Hum. Mol. Genet.* 5: 1029–1033.
137. Roewer L., Krawczak M., Willuweit S., Nagy M., Alves C., Amorim A., Anslinger K., Augustin C., Betz A., Bosch E., Caglià A., Carracedo A., Corach D., Dekairelle A.F., Dobosz T., Dupuy B.M., Füredi S., Gehrig C., Gusmao L., Henke J., Henke L., Hidding M., Hohoff C., Hoste B., Jobling M.A., Kärger H.J., de Knijff P., Lessig R., Liebeherr E., Lorante M., Martínez-Jarreta B., Nievas P., Nowak M., Parson W., Pascali V.L., Penacino G., Płoski R., Rolf B., Sala A., Schmidt U., Schmitt C., Schneider P.M., Szibor R., Teifel-Greding J., Kayser M. (2001) Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes. *Forensic Sci. Int.* 118: 106–113.
138. Rolf B., Keil W., Brinkmann B., Roewer L., Fimmers R. (2001) Paternity testing using Y-STR haplotypes: assigning a probability for paternity in cases of mutations. *Int. J. Legal Med.* 115: 12–15.

139. Rolf B., Meyer E., Brinkmann B., de Knijff P. (1998) Polymorphism at the tetranucleotide repeat locus DYS389 in 10 populations reveals strong geographic clustering. *Eur. J. Hum. Genet.* 6: 583–588.
140. Rootsi S., Magri C., Kivisild T., Benuzzi G., Help H., Bermisheva M., Kutuev I., Barac L., Pericic M., Balanovsky O., Pshenichnov A., Dion D., Grobei M., Zhivotovsky L.A., Battaglia V., Achilli A., Al-Zahery N., Parik J., King R., Cinnioğlu C., Khusnutdinova E., Rudan R., Balanovska E., Scheffrahn W., Simonescu M., Brehm A., Goncalves R., Rosa A., Moisan J.-P., Chaventre A., Ferak V., Füredi S., Oefner P.J., Shen P., Beckman L., Mikerezi I., Terzić R., Primorac D., Cambon-Thomsen A., Krumina A., Torroni A., Underhill P.A., Santachiara-Benerecetti A.S., Villems R., Semino O. (2004) Phylogeography of Y-chromosome haplogroup I reveals distinct domains of prehistoric gene flow in Europe. *Am. J. Hum. Genet.* 75: 128–137.
141. Rosenblum B.B., Oaks F., Menchen S., Johnson B. (1997) Improved single-strand DNA sizing accuracy in capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 25: 3925–3929.
142. Rosler A., Bailey L., Jones S., Briggs J., Cuss S., Horsey I., Kenrick M., Kingsmore S., Kent L., Pickering J., Knott T., Shipstone E., Scozzafava G. (2001) Rolling cycle amplification for scoring single nucleotide polymorphisms. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 20: 893–894.
143. Ross P.L., Belgrader P. (1997) Analysis of short tandem repeat polymorphisms in human DNA by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 69: 3966–3972.
144. Rosser Z.H., Zerjal T., Hurler M.E., Adojaan M., Alavantic D., Amorim A., Amos W., Armenteros M., Arroyo E., Barbujani G., Beckman G., Beckman L., Bertranpetit J., Bosch E., Bradley D.G., Brede G., Cooper G., Corte-Real H.B., de Knijff P., Decorte R., Dubrova Y.E., Evgrafov O., Gilissen A., Glisic S., Golge M., Hill E.W., Jeziorowska A., Kalaydjieva L., Kayser M., Kivisild T., Kravchenko S.A., Krumina A., Kucinskas V., Lavinha J., Livshits L.A., Malaspina P., Maria S., McElreavey K., Meitinger T.A., Mikelsaar A.V., Mitchell R.J., Nafa K., Nicholson J., Norby S., Pandya A., Parik J., Patsalis P.C., Pereira L., Peterlin B., Pielberg G., Prata M.J., Previdere C., Roewer L., Rootsi S., Rubinsztein D.C., Saillard J., Santos F.R., Stefanescu G., Sykes B.C., Tolun A., Villems R., Tyler-Smith C., Jobling M.A. (2000) Y-chromosomal diversity in Europe is clinal and influenced primarily by geography rather than by language. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 1526–1543.
145. Ruitberg C.M., Reeder D.J., Butler J.M. (2001) STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Res.* 29: 320–322.
146. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491.
147. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350–1354.
148. Sajantila A., Puomilahti S., Johnsson V., Ehnholm C. (1992) Amplification of reproducible allele markers for amplified fragment length polymorphism analysis. *Biotechniques* 12: 16, 18, 20–22.
149. Sánchez-Diz P., Gusmão L., Beza S., Benítez-Páez A., Castro A., García O., Solla L.P., Gada H., Martín P., Martínez-Jarreta B., de Fátima Pinheiro M., Raimondi E., Silva de la Fuente S.M., Vide M.C., Whittle M.R., Zarrabeitia M.T., Carracedo A., Amorim A. (2003) Results of the GEP-ISFG collaborative study on two Y-STRs tetraplexes: GEPY I (DYS461, GATA C4, DYS437 and DYS438) and GEPY II (DYS460, GATA A10, GATA H4 and DYS439). *Forensic Sci. Int.* 135: 158–162.
150. Santos F.R., Bianchi N.O., Rena S.D.J. (1996) Worldwide distribution of human Y-chromosome haplotypes. *Genome Res.* 1: 601–611.
151. Sasaki M., Shiono H. (1999) The polymorphisms of DYS388 and DYS392 on the Y chromosome in Japanese and German populations. *Int. J. Legal Med.* 112: 132–133.
152. Schlenk J., Seidl S., Braunschweiger G., Betz P., Lederer T. (2004) Development of a 13-locus PCR multiplex system for paternity testing. *Int. J. Legal Med.* 118: 55–61.
153. Schmidt U., Lutz S., Roewer L. (2003) A nomenclature for YCA II which is compatible with the ISFG guidelines for Y-STR analysis. *Int. Congr. Ser.* 1239: 481–485.

154. Schmitt C., Schmutzler A., Prinz M., Staak M. (1994) High sensitive DNA typing approaches for the analysis of forensic evidence: comparison of nested variable number of tandem repeats (VNTR) amplification and a short tandem repeats (STR) polymorphism. *Forensic Sci. Int.* 66: 129–141.
155. Schneider S., Roessli D., Excoffier L. (2000) Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
156. Schoske R., Vallone P.M., Kline M.C., Redman J.W., Butler J.M. (2004) High-throughput Y-STR typing of U.S. populations with 27 regions of the Y chromosome using two multiplex PCR assays. *Forensic Sci. Int.* 139: 107–121.
157. Seielstad M.T., Minch E., Cavalli-Sforza L.L. (1998) Genetic evidence for a higher female migration rate in humans. *Nat. Genet.* 20: 278–280.
158. Semino O., Passarino G., Oefner P.J., Lin A.A., Arbuzova S., Beckman L.E., de Benedictis G., Francalacci P., Kouvatsi A., Limborska S., Marcikić M., Mika A., Mika B., Primorac D., Santachiara-Benerecetti A.S., Cavalli-Sforza L.L., Underhill P.A. (2000) The genetic legacy of Paleolithic Homo sapiens sapiens in extant Europeans: a Y chromosome perspective. *Science* 290: 1155–1159.
159. Shaler T.A., Wickham J.N., Sannes K.A., Wu K.J., Becker C.H. (1996) Effect of impurities on the matrix-assisted laser desorption mass spectra of single-stranded oligodeoxynucleotides. *Anal. Chem.* 68: 576–579.
160. Shigemori Y., Mikawa T., Shibata T., Oishi M. (2005) Multiplex PCR: use of heat-stable *Thermus thermophilus* RecA protein to minimize non-specific PCR products. *Nucleic Acids Res.* 33: e126.
161. Shin D.J., Jin H.J., Kwak K.D., Choi J.W., Han M.S., Kang P.W., Choi S.K., Kim W. (2001) Y-chromosome multiplexes and their potential for the DNA profiling of Koreans. *Int. J. Legal Med.* 115: 109–117.
162. Singer V.L., Jones L.J., Yue S.T., Haugland R.P. (1997) Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Anal. Biochem.* 249: 228–238.
163. Sinha S.K., Budowle B., Chakraborty R., Paunovic A., DeVille Guidry R., Larsen C., Lal A., Shaffer M., Pineda G., Sinha S.K., Schneida E., Nasir H., Shewale J.G. (2004) Utility of the Y-STR typing systems Y-PLEX 6 and Y-PLEX 5 in forensic casework and 11 Y-STR haplotype database for three major population groups in the United States. *J. Forensic Sci.* 49: 691–700.
164. Sparkes R., Kimpton C., Gilbard S., Carne P., Andersen J., Oldroyd N., Thomas D., Urquhart A., Gill P. (1996) The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (II). Artefacts, casework studies and success rates. *Int. J. Legal Med.* 109: 195–204.
165. Spiroski M., Arsov T., Krüger C., Willuweit S., Roewer L. (2005) Y-chromosomal STR haplotypes in Macedonian population samples. *Forensic Sci. Int.* 148: 69–73.
166. Stępień P. (1996) Molekularne podstawy ewolucji. W: Węgłęński P. (red.), *Genetyka molekularna*: 412–437. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
167. Stieber Z. (1979) *Zarys gramatyki porównawczej języków słowiańskich*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
168. Sykes B., Irven C. (2000) Surnames and the Y chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 1417–1419.
169. Szczerkowska Z. (1998) *Badania biologiczne w sądowym ustalaniu ojcostwa*. Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych, Kraków.
170. Szczerkowska Z., Kapińska E. (1995) Badania polimorfizmu DNA – VNTR locus D1S80 (MCT 118) metodą PCR. *Ann. Acad. Med. Gedan.* 25: 259–266.
171. Szczerkowska Z., Kapińska E., Wysocka J., Cybulska L. (2004) Northern Polish population data and forensic usefulness of 15 autosomal STR loci. *Forensic Sci. Int.* 144: 69–71.
172. Szczerkowska Z., Wysocka J., Kapińska E., Cybulska L. (2001) Genetyczna zmienność w obrębie 14-tu loci typu VNTR w populacji Polski Północnej. *Arch. Med. Sądowej Kryminol.* 51: 227–232.
173. Tang J.P., Hou Y.P., Li Y.B., Wu J., Zhang J., Zhang H.J. (2003) Characterization of eight Y-STR loci and haplotypes in a Chinese Han population. *Int. J. Legal Med.* 117: 263–270.

174. Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24: 4876–4882.
175. Turner A. (2001) MRCA Calculator. Beta Version 0.1. MyFamily.com, Provo, Utah.
176. Vallone P.M., Devaney J.M., Marino M.A., Butler J.M. (2002) A strategy for examining complex mixtures of deoxyoligonucleotides using ion-pair–reverse-phase high-performance liquid chromatography, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, and informatics. *Anal. Biochem.* 304: 257–265.
177. van den Boom D., Jurinke C., McGinniss M.J., Berkenkamp S. (2001) Microsatellites: perspectives and potentials of mass spectrometric analysis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 1: 383–393.
178. Walsh B. (2001) Estimating the time to the most recent common ancestor for the Y chromosome or mitochondrial DNA for a pair of individuals. *Genetics* 158: 897–912.
179. Walsh P.S., Fildes N.J., Reynolds R. (1996) Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res.* 24: 2807–2812.
180. White H.W., Kusakawa N. (1997) Agarose-based system for separation of short tandem repeat loci. *Biotechniques* 22: 976–980.
181. Wiegand P., Kleiber M. (2001) Less is more – length reduction of STR amplicons using redesigned primers. *Int. J. Legal Med.* 114: 285–287.
182. Y Chromosome Consortium (2002) A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Res.* 12: 339–348.
183. Zerjal T., Beckman L., Beckman G., Mikelsaar A.-V., Krumina A., Kučinskis V., Hurles M.E., Tyler-Smith C. (2001) Geographical, linguistic and cultural influences on genetic diversity: Y-chromosomal distribution in Northern European populations. *Mol. Biol. Evol.* 18: 1077–1087.
184. Zielińska A. (1992) Rosyjskie elementy leksykalne i fleksyjno-składniowe w polszczyźnie staroobrzędowców zamieszkałych we wsiach Wodziłki i Gabowe Grądy. W: Maćkiewicz J., Siatkowski J. (red.), *Język a kultura*, tom 7. *Kontakty języka polskiego z innymi językami na tle kontaktów kulturowych*: 111–116. Wiedza o Kulturze, Wrocław.

10. ZAŁĄCZNIK

Haplotypy 18 loci STR chromosomu Y w populacjach: polskiej, słowackiej i białoruskiej

Lp.	DYS 19	DYS 388	DYS 389I	DYS 389II	DYS 390	DYS 391	DYS 392	DYS 393	DYS 426	DYS 437	DYS 438	DYS 439	DYS 460	GATA H4.1	DYS 385	YCA II	PL	SK	BY Pls	BY C	BY Pdzv
1.	13	12	12	29	24	10	11	13	11	14	10	13	9	21	16,18	19,21	1				
2.	13	12	12	30	23	11	11	13	11	14	10	12	10	18	16,18	19,21	1				
3.	13	12	12	31	24	10	11	14	11	15	10	11	11	21	15,18	21,22				1	
4.	13	12	13	29	23	10	11	13	11	14	10	12	9	21	17,19	19,21			1		
5.	13	12	13	30	23	10	11	13	11	14	10	12	10	21	16,18	19,21		1			
6.	13	12	13	30	24	10	11	13	11	14	10	12	9	20	15,17	19,21				1	
7.	13	12	13	30	24	10	11	13	11	14	10	12	9	21	16,17	19,21	1			1	
8.	13	12	13	30	24	10	11	13	11	14	10	12	9	21	16,18	19,21		1		1	
9.	13	12	13	30	24	10	11	13	11	14	10	12	9	21	17,17	19,21		1			
10.	13	12	13	30	24	10	11	13	11	14	10	13	9	21	16,19	19,21				1	
11.	13	12	13	30	24	10	11	13	11	14	11	12	9	20	17,19	19,21				1	
12.	13	12	13	30	24	10	11	13	11	14	9	12	9	20	16,16	19,21					1
13.	13	12	13	30	24	10	12	14	11	14	10	12	9	20	16,18	19,21		1			
14.	13	12	13	30	24	11	13	13	12	15	12	12	11	21	11,13	19,23	1				
15.	13	12	13	30	25	10	11	13	11	14	10	12	10	20	16,18	19,21					1
16.	13	12	13	30	25	9	11	14	11	14	10	12	10	20	17,18	19,19	1				
17.	13	12	13	31	24	10	11	13	11	14	10	11	10	20	16,18	21,22	1				
18.	13	12	13	31	24	10	11	13	11	14	10	13	11	20	15,17	19,22		1			
19.	13	12	13	31	25	10	11	13	11	14	10	12	9	21	17,17	19,21		1			
20.	13	12	13	31	25	10	11	13	11	14	11	12	9	21	16,18	19,21	1				
21.	13	12	13	32	25	10	11	13	11	14	10	12	9	21	17,18	19,21	1				
22.	13	12	14	30	23	10	13	13	11	16	9	11	11	19	13,15	23,24		1			
23.	13	12	14	31	24	10	11	13	11	14	10	12	10	21	16,18	19,20				1	
24.	13	12	14	31	24	10	11	13	11	14	10	13	9	21	16,21	21,21		1			
25.	13	14	12	28	22	10	11	13	11	16	10	11	11	20	13,15	19,21	1				
26.	14	12	12	28	23	10	11	13	11	16	10	11	10	20	13,13	19,21				1	
27.	14	12	12	28	24	11	13	13	12	15	12	12	11	21	11,14	19,23	1				
28.	14	12	12	28	24	11	13	14	13	15	11	12	11	21	11,13	19,24	1				
29.	14	12	12	29	23	10	11A	14	11	16	10	11	11	21	13,14	20,20		1			
30.	14	12	12	31	24	10	11	13	12	14	11	10	11	22	11,15	20,23					1
31.	14	12	13	28	22	11	13	13	12	15	12	11	10	22	11,14	19,23				1	
32.	14	12	13	28	23	10	14	14	11	14	11	10	11	21	11,12	18,20	1				
33.	14	12	13	28	23	11	14	13	11	14	10	10	12	21	11,13	18,20				1	

73.	14	12	13	31	24	10	11	15	11	14	10	11	11	20	15,18	19,21			1		
74.	14	12	13	31	25	10	11	13	12	14	11	10	11	22	11,15	19,23					1
75.	14	12	14	30	23	10	13	13	12	15	11	12	11	21	11,14	19,23		1			
76.	14	12	14	30	23	10	14	14	11	14	10	10	10	21	11,13	18,20	1				
77.	14	12	14	30	23	11	14	14	11	14	10	10	11	21	11,13	18,20					1
78.	14	12	14	30	24	10	14	13	11	14	10	10	11	21	10,15	18,20	1				
79.	14	12	14	30	24	11	13	12	12	15	12	11	11	21	11,14	19,23					1
80.	14	12	14	30	24	11	13	13	12	14	12	11	10	21	12,14	19,23	1				
81.	14	12	14	30	25	12	11	13	12	14	11	11	12	20	11,14	19,23	1				
82.	14	12	14	31	24	10	11	13	11	14	10	12	11	17	18,19	20,21			1		
83.	14	12	14	31	24	10	13	12	12	14	12	12	11	19	11,13	19,23		1			
84.	14	12	14	31	25	10	13	12	11	16	12	12	10	20	11,14	19,23	1				
85.	14	12	14	32	24	10	11	13	11	14	10	12	11	21	16,17	21,22	1				
86.	14	12	14	32	24	11	14	13	11	14	10	10	11	20	11,13	18,20					1
87.	14	13	13	30	24	11	13	12	12	15	12	12	11	21	11,14	19,23		1			
88.	14	13	13	31	24	10	11	13	11	15	10	12	10	20	14,15	21,21	1				
89.	14	13	13	31	24	11	11	13	11	15	10	12	10	20	14,14	21,21	1				
90.	14	13	14	30	23	10	12	12	11	14	10	12	10	20	12,13	20,22	1				
91.	14	13	14	31	25	9	11	13	11	14	10	11	10	21	16,17	19,22	1				
92.	14	14	12	27	22	11	11	14	11	16	10	11	10	20	13,14	19,21	1				
93.	14	14	12	28	21	10	11	13	11	16	10	12	11	20	13,14	19,21	1				
94.	14	14	12	28	22	10	11	12	11	15	10	12	10	20	13,15	19,21		1			
95.	14	14	12	28	22	10	11	13	11	16	10	11	10	20	14,14	19,21		1			
96.	14	14	12	28	22	10	11	13	11	16	10	11	10	20	14,16	19,21		1			
97.	14	14	12	28	22	10	11	13	11	16	10	11	10	20	14,17	19,21		1			
98.	14	14	12	28	22	10	11	13	11	16	10	11	10	21	13,15	19,21					1
99.	14	14	12	28	22	10	11	13	11	16	10	11	11	19	13,14	19,21	1				
100.	14	14	12	28	22	10	11	13	11	16	10	11	11	20	13,14	19,21			1		
101.	14	14	12	28	22	10	11	14	11	16	10	11	10	19	14,15	19,21					1
102.	14	14	12	28	22	10	11	14	11	16	10	11	11	21	14,14	19,21		1			
103.	14	14	12	28	22	10	12	12	11	17	10	12	11	20	14,14	19,20					1
104.	14	14	12	28	22	11	12	13	11	16	10	11	10	20	14,14	19,21	1				
105.	14	14	12	28	22	11	12	13	11	16	10	11	10	20	14,15	19,21			1		
106.	14	14	12	28	22	11	12	13	11	16	10	11	11	20	14,14	19,21	1				
107.	14	14	12	28	23	10	11	13	11	15	10	11	10	20	13,13	19,21		1			
108.	14	14	12	28	23	10	11	13	11	16	10	11	10	20	13,14	19,21	1		1		
109.	14	14	12	28	23	10	11	13	11	16	10	11	10	20	13,15	19,21					1
110.	14	14	12	28	23	10	11	13	11	16	10	11	10	20	14,15	19,21	1				
111.	14	14	12	29	22	10	11	13	10	17	10	12	10	20	13,14	19,21		1			

112.	14	14	12	29	23	10	11	13	11	16	10	11	10	20	15,15	19,21				1	
113.	14	14	12	30	23	10	11	13	11	16	10	11	11	20	14,15	19,21	1				1
114.	14	14	13	29	22	10	11	13	11	16	10	11	9	20	12,14	19,21					1
115.	14	15	13	28	22	10	11	11	11	15	9	13	11	20	14,16	19,22					1
116.	14	15	13	28	24	10	11	12	11	16	9	11	10	20	13,17	19,24		1			
117.	14	16	12	28	22	9	11	14	11	16	10	11	10	20	13,13	19,21					1
118.	14	16	12	29	23	10	11	12	11	14	10	11	12	20	13,17	22,22		1			
119.	14	16	13	29	24	10	13	12	11	14	11	10	11	19	17,18	19,22			1		
120.	14	16	13	31	23	10	11	12	11	14	10	11	10	20	13,17	22,22	1				
121.	14	16	14	30	23	11	11	12	11	14	9	11	10	21	13,17	19,22					1
122.	14	17	14	30	23	10	12	12	11	15	9	13	10	22	14,14	19,22	1				
123.	15	11	13	29	23	12	14	14	11	14	10	10	11	21	11,13	18,20			1		
124.	15	11	13	29	25	11	11	13	12	14	11	11	11	22	11,15	19,23			1		
125.	15	12	12	28	22	10	10	14	11	16	10	11	10	20	15,16	20,21					1
126.	15	12	12	28	22	10	11	14	11	15	10	11	12	21	15,16	20,20	1				
127.	15	12	12	28	22	10	11	14	11	15	11	11	11	21	15,16	20,20	1				
128.	15	12	12	28	23	11	14	14	11	14	10	10	11	21	11,14	18,20		1			
129.	15	12	12	29	21	11	11	14	11	16	10	11	9	20	13,16	19,20	1				
130.	15	12	12	29	22	10	11	14	11	16	10	12	11	21	14,15	20,21		1			
131.	15	12	12	29	25	11	11	13	12	14	12	10	11	21	12,14	19,22	1				
132.	15	12	13	29	22	10	11	14	11	15	10	11	11	20	15,16	20,20			1		
133.	15	12	13	29	23	10	14	14	11	14	10	10	10	21	11,14	18,20			1		
134.	15	12	13	29	23	10	14	14	11	14	10	10	11	21	11,11	18,20					1
135.	15	12	13	29	23	11	14	13	11	14	10	10	11	21	11,14	18,20			1		
136.	15	12	13	29	23	11	14	14	11	14	10	10	11	20	11,14	18,20	1				2
137.	15	12	13	29	23	11	14	14	11	14	10	10	11	21	11,14	18,20		1			1
138.	15	12	13	29	23	11	14	14	11	14	10	10	12	21	11,13	18,20					1
139.	15	12	13	29	24	10	11	14	12	14	11	11	11	20	11,14	19,23			1		
140.	15	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	11	20	11,14	19,19			1		
141.	15	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	11	21	10,14	19,23	1				
142.	15	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	11	21	11,14	19,19	1				
143.	15	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	11	22	11,15	19,23			1		
144.	15	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	12	21	11,14	19,19	1				
145.	15	12	13	29	25	10	13	13	12	15	12	12	11	20	11,15	19,23			1		
146.	15	12	13	29	25	11	11	13	12	14	11	10	11	20	11,14	19,23			1		
147.	15	12	13	29	25	11	11	13	12	14	11	10	11	21	11,14	19,23	1				1
148.	15	12	13	29	25	11	11	13	12	14	11	11	11	22	11,15	19,23			1		
149.	15	12	13	29	25	11	11	13	12	14	11	11	12	21	12,15	19,23			1		
150.	15	12	13	29	25	11	11	13	12	14	11	11	12	21	12,15	19,24			1		

151.	15	12	13	29	25	12	11	13	12	14	11	11	10	22	11,14	19,23				1	
152.	15	12	13	30	23	11	14	14	11	14	10	10	11	21	12,14	18,20		1			
153.	15	12	13	30	24	11	11	13	12	14	11	10	10	21	11,14	19,23					1
154.	15	12	13	30	24	11	11	13	12	14	11	10	11	21	12,14	19,22	1				
155.	15	12	13	30	24	11	11	13	12	14	11	10	11	22	11,14	19,23					1
156.	15	12	13	30	24	11	11	13	12	14	12	11	11	21	11,14	19,23			1		
157.	15	12	13	30	24	12	11	13	12	14	11	10	11	21	11,14	19,23	1				
158.	15	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	10	20	11,14	19,23		1			
159.	15	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	10	21	11,13	19,23					1
160.	15	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	10	22	11,14	19,23				1	
161.	15	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	10	22	11,15	19,23	1				
162.	15	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	11,13	19,23		1			
163.	15	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	11,14	19,23	1				
164.	15	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	11	22	11,14	19,23	1	1			
165.	15	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	12	21	11,14	19,23	1				
166.	15	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	12	22	11,14	19,23		1			
167.	15	12	13	30	25	11	11	13	12	14	11	10	10	21	11,15	19,23				1	
168.	15	12	13	30	25	11	11	13	12	14	11	10	11	21	11,14	19,23	2				
169.	15	12	13	30	25	11	11	13	12	14	11	10	11	22	11,14	19,23			1		1
170.	15	12	13	30	25	11	11	13	12	14	11	10	11	22	12,16	19,23			1		
171.	15	12	13	30	25	11	11	13	12	14	11	11	11	21	11,14	19,23			1		
172.	15	12	13	30	25	11	11	13	12	14	11	11	11	22	11,14	19,22			1		
173.	15	12	13	30	25	11	11	13	12	14	12	10	11	20	12,14	19,23			1		
174.	15	12	13	30	25	11	11	13	12	14	12	10	11	21	12,14	19,23	1				
175.	15	12	13	30	25	11	11	13	12	14	12	11	10	21	12,14	19,23	2				
176.	15	12	13	30	26	11	11	13	12	14	11	11	11	23	11,14	19,23					1
177.	15	12	13	31	24	10	11	13	12	14	11	10	11	22	11,15	19,23			1		
178.	15	12	13	31	24	11	11	13	12	14	11	10	11	20	11,15	19,23			1		
179.	15	12	13	31	24	11	11	13	12	14	11	10	11	21	11,15	19,23			1		
180.	15	12	13	31	25	11	11	13	12	14	11	10	11	22	11,14	19,23					1
181.	15	12	13	31	25	11	11	13	12	14	11	10	11	22	11,15	19,23			1		2
182.	15	12	13	31	25	11	11	13	12	14	12	10	11	21	12,14	19,23	1				
183.	15	12	13	31	26	11	11	13	12	14	11	10	12	22	11,14	19,23					1
184.	15	12	13	32	23	11	14	15	11	14	10	10	11	21	11,13	18,20	1				
185.	15	12	13	32	25	11	11	13	12	14	12	10	11	22	12,15	19,22			1		
186.	15	12	14	30	22	10	11	12	11	14	9	11	11	21	15,17	19,21		1			
187.	15	12	14	30	22	11	12	14	11	16	10	11	11	21	13,17	20,20	1				
188.	15	12	14	30	23	11	14	13	11	14	10	10	11	21	11,13	18,20				1	
189.	15	12	14	30	23	11	14	14	11	14	10	10	11	21	11,13	18,20	1				1

190.	15	12	14	30	23	11	14	14	11	14	10	10	11	22	10,13	18,20			1			1
191.	15	12	14	30	23	11	14	14	11	14	10	10	12	21	11,14	18,20			1			1
192.	15	12	14	30	23	11	14	14	11	14	10	11	12	21	11,13	18,20				1		
193.	15	12	14	30	23	11	15	14	11	14	10	10	10	21	11,13	18,20			1			
194.	15	12	14	30	24	10	14	14	11	14	10	10	10	21	11,13	18,20				1		
195.	15	12	14	30	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	11,14	19,23			1			
196.	15	12	14	30	25	11	11	13	12	14	11	11	11	22	11,15	19,23		1				
197.	15	12	14	30	26	10	11	13	12	14	11	11	11	23	11,16	19,23		1				
198.	15	12	14	31	23	10	11	13	11	16	10	11	11	21	13,16	20,22						1
199.	15	12	14	31	23	10	14	15	11	14	10	10	11	21	11,13	18,20			1			
200.	15	12	14	31	23	11	14	14	11	14	10	10	9	21	11,13	18,20	1					
201.	15	12	14	31	23	11	14	14	11	14	10	11	12	21	11,13	18,20			1			
202.	15	12	14	31	24	10	13	13	12	15	12	12	10	20	11,14	19,23		1				
203.	15	12	14	31	24	11	11	13	12	14	11	10	11	22	11,14	19,23						1
204.	15	12	14	31	24	11	13	13	12	16	12	12	11	21	11,13	19,24		1				
205.	15	12	14	31	25	11	11	13	12	14	11	10	11	21	11,14	19,23	1					
206.	15	12	14	32	25	10	11	13	12	14	11	10	10	21	12,14	19,23	1					
207.	15	12	14	32	25	11	11	13	12	14	11	10	11	22	12,15	19,23				1		
208.	15	13	12	28	23	10	13	13	11	16	10	11	10	20	14,14	19,21				1		
209.	15	13	12	29	22	10	11	13	11	16	10	12	10	21	14,14	20,20		1				
210.	15	13	12	29	22	10	11	14	11	15	10	11	10	21	14,15	19,20	1					
211.	15	13	12	29	24	10	11	13	11	16	10	12	10	20	14,14	19,21	1					
212.	15	13	12	30	22	10	11	13	11	16	10	11	10	21	14,14	20,20			1			
213.	15	13	13	30	22	11	11	14	11	16	10	11	10	22	14,14	20,20			1			
214.	15	13	13	30	23	10	12	14	11	14	10	13	10	20	15,15	19,21	1					
215.	15	13	13	30	24	11	11	13	11	15	10	13	10	21	14,15	20,21						1
216.	15	13	13	30	24	11	11	13	12	14	11	10	11	22	10,17	19,23	1					
217.	15	13	13	31	23	10	12	14	11	14	10	11	11	19	13,15	19,21	1					
218.	15	13	13	31	23	11	11A	14	11	16	11	11	11	21	13,14	20,20		1				
219.	15	13	13	31	24	10	11	13	11	15	10	13	10	20	14,15	20,21				1		
220.	15	13	13	31	24	11	11	13	11	15	10	12	10	20	14,15	21,21				1		
221.	15	13	13	31	24	11	11	13	11	15	10	12	10	20	14,16	21,21					1	
222.	15	13	13	31	24	11	11	13	11	15	10	13	10	20	14,14	21,21		1				
223.	15	13	13	31	24	11	11	13	11	15	10	14	10	20	15,15	19,21					1	
224.	15	13	13	31	24	11	11	14	11	15	10	12	10	20	14,15	21,21		1				
225.	15	13	13	31	24	11	11	14	11	15	10	14	10	20	14,15	21,21		1				
226.	15	13	13	31	25	11	11	13	11	15	10	12	10	20	14,15	21,21				1		
227.	15	13	14	32	24	10	12	14	11	14	10	11	11	20	14,15	19,21	1					
228.	15	13	14	33	23	10	12	15	11	14	10	11	11	20	15,16	19,21		1				

229.	15	14	12	28	22	10	11	13	11	16	10	10	10	20	12,14	19,21	1					
230.	15	14	12	28	23	10	11	13	11	15	10	11	10	20	14,15	19,21		1				
231.	15	14	12	28	23	10	11	13	11	15	10	11	11	20	14,15	19,21		1				
232.	15	14	12	28	23	10	11	13	11	16	10	12	10	20	14,14	19,21	1					
233.	15	14	12	28	23	11	11	13	11	16	10	11	11	21	14,14	19,21					1	
234.	15	14	13	30	24	10	11	13	11	15	10	11	10	20	14,14	19,21	1					
235.	15	15	12	28	24	10	11	12	11	16	10	12	12	20	14,17	19,20	1					
236.	15	15	12	28	24	10	11	12	11	16	9	12	11	20	13,18	19,20		1				
237.	15	15	12	28	24	10	11	12	11	16	9	13	11	20	13,17	19,20					1	
238.	15	15	12	29	24	10	11	12	11	16	9	12	10	20	15,18	19,20		1				
239.	15	15	14	30	23	10	11	13	11	14	10	12	10	20	12,16	21,21	1					
240.	15	16	12	28	25	10	11	12	11	15	9	13	11	20	15,15	20,20	1					
241.	15	16	13	31	24	12	11	12	11	14	10	11	12	20	15,18	22,22		2				
242.	15	17	12	28	23	9	11	12	11	15	9	12	10	20	12,17	21,22			1			
243.	16	12	12	28	22	10	12	13	11	17	10	12	11	20	11,14	19,20					1	
244.	16	12	12	28	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,14	19,23	1					
245.	16	12	12	28	25	10	11	13	12	14	11	11	11	21	11,14	19,19		1				
246.	16	12	12	28	25	10	11	13	12	14	11	11	11	21	11,14	19,23			1			
247.	16	12	12	28	25	11	11	13	12	14	11	11	11	22	11,15	19,23					1	
248.	16	12	12	29	24	10	11	13	12	14	11	10	11	22	11,14	19,24			1			
249.	16	12	12	29	24	10	11	14	12	14	11	10	11	22	11,15	19,23			1			
250.	16	12	12	29	24	11	11	13	12	14	11	11	11	21	11,14	19,23						1
251.	16	12	12	29	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,14	19,23	1					
252.	16	12	12	29	25	10	11	13	12	14	11	12	11	21	10,14	19,23	1					
253.	16	12	12	29	25	10	11	13	12	14	12	10	10	21	11,14	19,23			1			
254.	16	12	12	29	25	11	11	13	12	14	10	10	11	22	11,15	19,23	1					
255.	16	12	13	28	25	10	11	13	12	14	11	11	11	21	11,14	19,23						1
256.	16	12	13	29	24	10	11	13	12	14	11	11	11	21	11,14	19,24						1
257.	16	12	13	29	24	10	11	13	12	14	11	12	10	21	11,14	19,23			1			
258.	16	12	13	29	24	10	11	14	12	14	11	11	10	21	11,14	19,23	1					
259.	16	12	13	29	24	11	11	13	12	14	11	10	11	22	11,15	19,23					1	
260.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	11,14	19,23	1					
261.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	10	11	22	11,15	19,24					1	
262.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	10	12	22	11,14	19,23	1					
263.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	10	20	11,14	19,23	1					
264.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	10	21	11,14	19,23					1	
265.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	10	22	11,14	19,23	1					
266.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	11	20	11,14	19,23			1			1
267.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	11	20	11,15	19,23	1					

268.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	11	21	10,14	19,23		1			
269.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	11	21	11,14	19,23	1	1			1
270.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	11	21	11,14	21,23			1		
271.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	11	21	11,15	19,23			1		1
272.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	11	21	14,14	19,23	1				
273.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	11	22	11,14	19,23			1		
274.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	12	21	11,14	19,19	1				
275.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	12	10	21	11,14	19,23		1			
276.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	12	11	21	11,14	19,19	1				
277.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	12	11	21	11,14	19,23	1				
278.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	12	11	21	11,15	19,23	1				
279.	16	12	13	29	25	10	11	13	12	14	12	11	11	21	11,13	19,23			1		
280.	16	12	13	29	25	10	11	14	12	14	11	11	10	21	11,14	19,23	1			1	
281.	16	12	13	29	25	10	11	14	12	14	11	12	10	21	11,14	19,23			1		
282.	16	12	13	29	25	10	12	13	12	14	11	11	11	21	11,15	19,23		1			
283.	16	12	13	29	25	10	12	14	12	14	11	11	10	21	11,14	19,23	1				
284.	16	12	13	29	25	11	11	13	12	14	11	10	11	21	11,14	19,23					1
285.	16	12	13	29	25	11	11	13	12	14	11	10	11	22	10,14	19,23	1				
286.	16	12	13	29	25	11	11	13	12	14	11	10	11	22	12,15	19,23			1		
287.	16	12	13	29	25	11	11	13	12	14	11	10	12	21	11,15	19,23	1				
288.	16	12	13	29	25	11	11	13	12	14	11	11	11	22	11,13	19,23					1
289.	16	12	13	29	26	10	11	13	12	14	11	11	11	21	11,14	19,23	2				
290.	16	12	13	29	26	10	11	13	12	14	12	11	11	22	11,15	19,23		1			
291.	16	12	13	30	22	11	11	13	12	14	11	11	11	21	11,14	19,23	1				
292.	16	12	13	30	23	11	11	13	12	14	11	11	11	21	11,14	19,21		1			
293.	16	12	13	30	23	11	13	13	12	15	13	11	11	20	11,14	19,23		1			
294.	16	12	13	30	24	10	11	13	12	14	11	10	10	21	11,14	19,23	1				
295.	16	12	13	30	24	10	11	13	12	14	11	10	11	21	11,14	19,23					1
296.	16	12	13	30	24	10	11	13	12	14	11	10	11	21	9,14	19,23	1				
297.	16	12	13	30	24	10	11	13	12	14	11	10	11	23	11,15	19,23			1		
298.	16	12	13	30	24	10	11	13	12	15	11	11	11	22	11,14	19,23		1			
299.	16	12	13	30	24	10	11	14	12	14	11	10	11	21	11,15	19,23					1
300.	16	12	13	30	24	11	11	13	12	14	11	10	10	22	11,14	23,23				1	
301.	16	12	13	30	24	11	11	13	12	14	12	12	11	21	11,14	19,23		2			
302.	16	12	13	30	24	11	11	14	12	14	11	11	11	21	11,14	19,19			1		
303.	16	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	10	21	11,14	19,23	1	3			
304.	16	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	11	20	10,14	19,23	1				
305.	16	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,14	19,23	1				
306.	16	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	11,14	19,23	2	1			

346.	16	12	13	31	25	11	11	13	12	14	11	10	11	21	11,14	19,23				1	
347.	16	12	13	31	25	11	11	13	12	14	11	11	11	21	11,14	19,23		1			
348.	16	12	13	31	25	11	11	13	12	14	11	11	11	22	11,14	19,23					1
349.	16	12	13	31	25	11	11	13	12	14	11	11	11	23	11,14	19,23		1			
350.	16	12	13	31	25	11	11	14	12	14	11	10	12	22	11,15	19,23		1			
351.	16	12	13	31	25	12	11	13	12	14	11	11	11	22	11,13	19,23			1		
352.	16	12	13	31	26	11	11	13	12	14	11	10	11	22	13,15	19,23	1				
353.	16	12	14	30	23	10	14	14	11	14	10	10	12	21	11,13	20,20	1				
354.	16	12	14	30	24	10	11	13	12	14	11	11	11	21	11,14	19,23		1			
355.	16	12	14	30	25	11	10	13	12	14	11	10	12	21	11,14	19,23		1			
356.	16	12	14	30	25	11	11	13	12	14	11	10	11	20	11,14	19,23		1			
357.	16	12	14	30	25	11	11	13	12	14	11	10	12	20	10,14	19,23		1			
358.	16	12	14	30	25	11	11	13	12	14	11	10	12	21	11,14	19,23		1	1		
359.	16	12	14	31	23	10	11	13	12	14	11	10	10	22	11,14	19,23				1	
360.	16	12	14	31	23	11	14	14	11	14	10	10	11	21	11,13	18,20	1				
361.	16	12	14	31	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,14	19,23	1				
362.	16	12	14	31	25	10	11	13	12	14	11	10	12	22	11,14	19,23					1
363.	16	12	14	31	25	10	11	13	12	14	11	12	10	21	10,14	19,23	1				
364.	16	12	14	31	25	11	11	13	12	14	11	10	11	21	11,14	19,23		2			
365.	16	12	14	31	25	11	11	13	12	14	11	11	12	21	11,14	19,23		1			
366.	16	12	14	31	25	11	11	13	12	14	11	12	11	22	11,15	19,23				1	
367.	16	12	14	31	26	11	11	13	12	14	11	10	11	21	11,14	19,23		1			
368.	16	12	14	32	23	11	11	13	12	14	11	10	12	20	11,14	19,23			1		
369.	16	12	14	32	24	11	11	11	12	14	11	10	11	22	11,14	19,23		1			
370.	16	12	14	32	25	10	11	13	12	14	11	10	10	21	11,14	19,23		1			
371.	16	12	14	32	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	11,14	19,23	1				
372.	16	12	15	32	25	11	11	13	12	14	11	10	11	21	11,14	19,23	1				
373.	16	13	12	30	24	10	11	13	11	15	10	12	10	20	14,15	21,21		1			
374.	16	13	13	29	22	10	13	14	11	14	10	11	11	20	16,16	19,21		1			
375.	16	13	13	29	23	10	12	14	11	15	10	11	11	20	15,15	18,19		1			
376.	16	13	13	29	23	11	11	13	12	14	11	10	11	20	12,14	19,23	1				
377.	16	13	13	29	25	11	11	13	12	14	11	10	12	20	11,14	19,23				1	1
378.	16	13	13	30	23	11	11	13	11	15	10	12	10	20	14,15	21,21	1				
379.	16	13	13	30	24	10	11	13	11	15	10	13	10	21	14,15	20,21			1		
380.	16	13	13	30	24	11	11	13	11	15	10	13	10	20	14,15	21,21	2			1	
381.	16	13	13	30	24	11	11	13	11	15	10	13	11	20	13,15	21,21			1		
382.	16	13	13	30	24	11	11	13	11	15	10	13	11	20	14,15	21,21			1		
383.	16	13	13	30	24	11	11	13	11	15	10	13	11	21	14,15	20,21					1
384.	16	13	13	30	24	11	11	13	11	15	11	14	10	20	14,15	20,21		1			

385.	16	13	13	30	24	11	11	13	11	16	10	13	10	20	14,16	21,21		1			
386.	16	13	13	30	24	11	11	14	11	15	10	13	11	20	14,15	21,21		1			
387.	16	13	13	31	23	10	11	13	11	15	10	12	10	20	14,17	21,21		1			
388.	16	13	13	31	24	10	11	13	11	15	10	13	10	20	14,14	21,21				1	
389.	16	13	13	31	24	10	11	13	11	15	10	13	11	20	14,15	21,21				1	
390.	16	13	13	31	24	11	11	13	11	15	10	12	10	20	14,15	21,21	1	3		1	1
391.	16	13	13	31	24	11	11	13	11	15	10	12	10	20	15,15	21,22		1			
392.	16	13	13	31	24	11	11	13	11	15	10	13	10	20	13,15	21,21				1	
393.	16	13	13	31	24	11	11	13	11	15	10	13	10	20	14,15	20,21		1			
394.	16	13	13	31	24	11	11	13	11	15	10	13	10	20	14,15	21,21	3				
395.	16	13	13	31	24	11	11	13	11	15	10	13	11	20	14,14	21,21				1	
396.	16	13	13	31	24	11	11	13	11	15	10	13	11	20	14,14	21,22	1				
397.	16	13	13	31	24	11	11	13	11	15	10	13	9	20	15,15	21,21		1			
398.	16	13	13	31	24	11	11	13	11	15	11	13	10	20	14,15	21,21		1			
399.	16	13	13	31	24	11	11	13	11	16	10	12	10	20	14,15	20,21				1	
400.	16	13	13	31	24	11	11	14	11	15	10	14	10	20	14,16	21,21		1			
401.	16	13	13	31	24	12	11	14	11	15	10	13	10	20	14,15	21,21	1				
402.	16	13	13	31	25	10	11	13	12	14	12	10	11	22	11,15	19,23	1				
403.	16	13	13	31	25	11	11	13	11	15	10	12	10	20	15,15	21,21		1			
404.	16	13	13	31	25	11	11	13	11	15	10	13	10	20	14,15	21,21	1	1			
405.	16	13	13	32	24	10	11	13	11	15	10	12	10	20	15,15	21,21					1
406.	16	13	13	32	24	11	11	13	11	14	10	12	10	20	14,15	21,21					1
407.	16	13	13	32	24	11	11	13	11	14	10	13	10	20	14,15	21,21				1	
408.	16	13	13	32	24	11	11	13	11	15	10	12	10	20	14,14	21,21		1			
409.	16	13	13	32	24	11	11	13	11	15	10	12	11	20	14,15	21,22				1	
410.	16	13	13	32	24	11	11	13	11	15	10	13	10	20	14,15	20,21					1
411.	16	13	13	32	24	11	11	13	11	15	10	13	10	20	14,15	21,21	1				1
412.	16	13	13	32	24	11	11	13	11	15	10	13	11	20	14,15	21,21				1	
413.	16	13	13	32	24	11	11	13	11	15	10	15	10	20	14,15	21,21					1
414.	16	13	13	32	24	11	11	14	11	15	10	13	10	20	13,15	21,21					1
415.	16	13	14	29	24	10	11	13	11	15	10	12	11	21	12,12	11,21	1				
416.	16	13	14	31	24	11	11	13	11	15	10	12	10	20	14,15	21,22				1	
417.	16	13	14	31	24	11	11	13	11	15	10	13	10	20	13,15	21,21					1
418.	16	13	14	31	24	11	11	13	11	15	10	13	10	20	14,15	21,21				1	
419.	16	13	14	33	25	10	11	13	11	15	10	12	10	20	14,15	21,21		1			
420.	16	14	12	28	22	11	11	13	11	16	10	12	11	20	13,14	19,21	1				
421.	16	14	13	31	24	11	11	14	11	15	10	13	10	20	14,15	20,21		1			
422.	16	14	14	30	25	10	11	13	11	14	10	10	10	20	12,13	22,23					1
423.	16	15	12	28	24	10	11	12	11	15	9	11	11	21	14,17	20,20	1				

424.	16	15	12	28	24	10	11	12	11	16	9	11	11	20	13,17	19,20					1		
425.	16	15	13	29	22	10	11	13	11	14	10	12	10	20	12,15	21,21	1						
426.	17	12	12	28	22	10	11	13	11	16	10	11	10	20	14,16	19,20		1					
427.	17	12	12	29	25	10	11	13	12	14	11	10	12	21	10,14	19,23	1						
428.	17	12	13	29	24	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,14	20,23	1						
429.	17	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,10	19,23	1						
430.	17	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,14	19,23	1	2					
431.	17	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	10	11	22	11,14	19,23		1					
432.	17	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	11	21	11,14	19,23						1	
433.	17	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	11	21	11,15	19,23	1						
434.	17	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	11	12	21	11,14	19,23	1						
435.	17	12	13	29	25	10	11	13	12	14	11	12	11	21	11,14	19,23						1	
436.	17	12	13	29	25	10	11	13	12	15	11	10	11	21	10,14	19,23	1						
437.	17	12	13	29	25	10	11	14	12	14	11	11	12	20	11,14	19,23	1						
438.	17	12	13	29	25	11	11	13	12	14	11	11	11	22	11,13	19,23	1						
439.	17	12	13	29	26	11	11	13	12	14	11	11	11	22	11,13	19,23	1						
440.	17	12	13	30	24	10	11	13	12	14	11	10	10	21	10,14	19,23		1					
441.	17	12	13	30	24	10	11	13	12	14	11	11	11	21	10,14	19,22		1					
442.	17	12	13	30	24	10	11	13	12	14	11	12	11	21	10,14	19,23		1					
443.	17	12	13	30	24	10	11	14	11	14	11	10	11	21	10,14	19,23	2						
444.	17	12	13	30	25	10	11	12	12	14	11	12	10	21	11,14	19,23					1		
445.	17	12	13	30	25	10	11	13	11	14	11	10	11	21	11,14	19,23	1						
446.	17	12	13	30	25	10	11	13	11	14	11	10	11	21	14,14	19,23	1						
447.	17	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	10	21	10,15	19,23	1						
448.	17	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	10	21	11,14	19,23	1						
449.	17	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	11	20	10,14	19,23	1	1					
450.	17	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,14	19,23	8	2			1		
451.	17	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,14	21,23	1						
452.	17	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,15	19,22		1					
453.	17	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,15	19,23	1						1
454.	17	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	11	11	21	10,14	19,22	1						
455.	17	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	11	11	21	10,14	19,23	1						
456.	17	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	11	11	22	10,15	19,23						1	
457.	17	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	11	12	21	10,13	19,23		1					
458.	17	12	13	30	25	10	11	13	12	14	11	12	11	21	10,14	19,23	1						
459.	17	12	13	30	25	10	11	14	11	14	11	10	10	20	10,14	23,23	1						
460.	17	12	13	30	25	11	11	13	12	14	11	10	11	21	10,11	19,23	1						
461.	17	12	13	30	25	11	11	13	12	14	11	10	11	21	10,13	19,23	1						
462.	17	12	13	30	25	11	11	13	12	14	11	10	11	21	10,14	19,23	1						

463.	17	12	13	30	25	11	11	13	12	14	11	10	11	21	11,14	19,23	1					
464.	17	12	13	30	25	11	11	13	12	14	11	10	11	21	11,15	19,23					1	
465.	17	12	13	30	25	11	11	13	12	14	11	11	11	21	11,14	19,23				1		
466.	17	12	13	30	26	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,14	19,23		1				
467.	17	12	13	30	26	10	11	13	12	14	11	10	12	21	10,14	19,23	1					
468.	17	12	13	30	26	10	11	13	12	14	11	11	12	21	10,14	18,23		1				
469.	17	12	13	31	23	11	14	14	11	14	10	10	11	22	11,14	18,20	1					
470.	17	12	13	31	24	10	11	13	12	14	11	10	12	22	11,14	19,23		1				
471.	17	12	13	31	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,13	19,23				1		
472.	17	12	13	31	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,14	19,23	1	1				
473.	17	12	13	31	25	10	11	13	12	14	11	10	11	22	11,14	19,22	1					
474.	17	12	13	31	25	10	12	13	12	14	11	10	11	21	10,13	19,23					1	
475.	17	12	13	31	25	11	11	13	12	14	11	10	11	22	10,14	19,23		1				
476.	17	12	13	31	25	11	11	13	12	14	11	10	11	22	11,14	19,23	1					
477.	17	12	13	31	25	11	11	13	12	14	11	11	10	22	11,13	19,23	1					
478.	17	12	14	30	24	11	11	13	12	14	13	10	11	22	11,14	19,23	1					
479.	17	12	14	30	25	10	11	13	12	14	11	10	12	21	10,14	19,23	1					
480.	17	12	14	31	24	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,14	19,23	1					
481.	17	12	14	31	25	10	11	13	12	14	11	10	10	22	11,14	19,21				1		
482.	17	12	14	31	25	10	11	13	12	14	11	10	11	21	10,14	19,23	2					
483.	17	12	14	31	25	10	11	13	12	14	11	11	11	21	10,15	19,23	1					
484.	17	12	14	31	25	11	11	13	12	14	11	10	11	22	11,15	19,22		1				
485.	17	12	14	31	26	10	11	13	12	14	11	10	11	20	10,15	19,24	1					
486.	17	13	12	28	25	10	11	14	11	15	10	11	10	19	14,16	19,19	1					
487.	17	13	13	30	23	11	9	13	11	15	10	12	11	20	14,15	21,21					1	
488.	17	13	13	30	24	10	11	13	11	15	10	13	11	20	14,15	21,21	1					
489.	17	13	13	30	24	11	11	13	11	15	10	12	10	20	15,15	21,21		1				
490.	17	13	13	30	24	11	11	13	11	15	10	13	10	20	14,14	21,21	1					
491.	17	13	13	30	24	11	11	13	11	15	10	13	10	20	14,15	21,21	1					
492.	17	13	13	31	24	11	11	13	11	15	10	11	10	20	14,15	21,21					1	
493.	17	13	13	31	24	11	11	13	11	15	10	12	10	20	14,15	21,21	1					
494.	17	13	13	31	24	11	11	13	11	15	10	13	10	20	14,15	21,21	1					
495.	17	13	13	31	24	11	12	13	11	15	10	11	10	20	14,15	21,21		1				
496.	17	13	13	31	24	11	12	13	11	15	10	12	10	20	14,15	21,21		1				
497.	17	13	13	32	24	10	11	13	11	15	10	12	10	20	14,15	21,21						1
498.	17	13	14	32	24	11	11	14	11	15	10	13	11	20	14,15	21,21		1				
499.	17	14	14	31	24	10	11	13	12	14	12	10	11	22	12,14	19,23						1
500.	del	12	13	29	23	10	13	13	12	15	12	12	11	21	11,14	19,23					1	
															<i>n</i>		208	164	71		72	53