

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
ODDZIAŁ MEDYCZYNY LABORATORYJNEJ

STUDIA JEDNOLITE MAGISTERSKIE
KIERUNEK: ANALITYKA MEDYCZNA

Ocena przydatności polimorfizmów insercyjno-
delecyjnych w genetyce sądowej

The assessment of insertion-deletion
polymorphisms in forensic genetics

Małgorzata Agnieszka Kloc

Nr albumu: 120497

Praca magisterska
napisana pod kierunkiem
prof. nadzw. dr hab. n. med. Renaty Jacewicz
Pracownia Genetyki Medycznej i Sądowej
Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej

Łódź 2017

Serdecznie dziękuję

Prof. nadzw. dr hab. n. med. Renacie Jacewicz

oraz

Dr n. med. Maciejowi Jędrzejczykowi

Za poświęcony czas i okazaną pomoc przy pisaniu pracy.

Spis treści:

1	Wstęp.....	4
1.1	Historia poznania polimorfizmów genomu ludzkiego.....	4
1.2	Polimorfizmy genetyczne wykorzystywane w badaniach identyfikacyjnych.....	6
1.3	Badania w zakresie markerów insercyjno-delecyjnych.....	9
1.4	Badania w zakresie markerów insercyjno-delecyjnych.....	9
2	Cele pracy.....	12
3	Materiał i metodyka.....	12
3.1	Materiał.....	12
3.2	Metodyka badań.....	13
3.3	Analiza statystyczna polimorfizmów insercyjno-delecyjnych.....	14
4	Wyniki badań.....	16
4.1	Analiza populacyjna i porównawcza.....	16
4.2	Analiza parametrów i przydatności.....	20
4.3	Analiza dystansów i filogenezy.....	32
4.4	Analiza spraw ojcostwa.....	34
5	Omówienie wyników i dyskusja.....	35
5.1	Analiza populacyjna i porównawcza.....	35
5.2	Analiza parametrów i przydatności.....	36
5.3	Analiza dystansów i filogenezy.....	39
5.4	Analiza spraw ojcostwa.....	40
6	Wnioski.....	41
7	Streszczenie.....	42
8	Piśmiennictwo.....	44
9	Spis rycin.....	50
10	Spis tabel.....	53

1 Wstęp

Genom człowieka składa się w ponad 99% z genomu jądrowego oraz genomu mitochondrialnego. W skład genomu jądrowego wchodzi 22 pary chromosomów autosomalnych oraz dwa chromosomy determinujące płeć. Ludzkie DNA stanowi około 3 miliardów par zasad. Ponad 99,7% jest wspólna dla wszystkich ludzi. Tylko 0,3% czyli ok. 10 milionów par zasad czyni każdego z nas wyjątkowym i niepowtarzalnym [1]. Badaniami DNA zajmuje się genetyka, z której w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku wyodrębniła się genetyka sądowa. Rozwija się ona w intensywnym tempie za sprawą wdrażania nowych technik identyfikacyjnych, dzięki rozwojowi informatyki oraz globalnej wymianie danych [2]. Genetyka sądowa analizuje zmienność genetyczną m.in. w aspekcie identyfikacyjnym oraz analiz pokrewieństwa.

1.1 Historia poznania polimorfizmów genomu ludzkiego

Za ojca genetyki powszechnie uważa się zakonnika Grzegorza Mendla, który badał model dziedziczenia cech, nazywanych później allelami. Miało to miejsce w 1865 roku. W 1900 roku Karl Landsteiner opisał układ grupowy AB0, a następnie w 1940 układ Rh. Udokumentował on zróżnicowanie w zakresie cech grupowych antygenów krwi występujące w populacji [3].

Kolejnym ważnym etapem było rozszyfrowanie budowy podwójnej helisy DNA przez Jamesa Watsona, Francisa Cricka oraz Rosalind Franklin w 1953 roku. W latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych XX kolejno odkryto enzymy restrykcyjne i opracowano technikę Southern blot. Frederick Sanger opracował metodę sekwencjonowania DNA. W 1980 przeprowadzono pierwszą analizę polimorficznego lokusa metodą Southern blot [3, 4].

Następnym przełomowym wydarzeniem było opracowanie przez Karego Mullisa w 1983 roku reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction - PCR). Technika ta umożliwia analizę w oparciu o pojedyncze komórki. Pierwsze użycie techniki PCR w genetyce sądowej dotyczyło polimorfizmu HLA DQ α . Zapoczątkowało to analizę krótkich tandemowych powtórzeń (ang. short tandem repeats - STR), które są używane w rutynowej pracy po dziś dzień [3].

Wkrótce potem, bo w 1985 roku w Europie Alec Jeffreys opracował multilokusowe sondy molekularne, które pozwalają analizować jednocześnie wiele polimorfizmów zmiennej liczby tandemowych powtórzeń, w skrócie VNTR (ang. variable number tandem repeat), przez co otrzymywany jest unikalny dla każdego kod fragmentów DNA. Znany jest on pod nazwą genetyczny odcisk palca (ang. DNA fingerprint). Rok później użyto tej metody do rozwiązania pierwszej imigracyjnej sprawy oraz ustalenia ojcostwa. Ta technika ma swoje ograniczenia, gdyż wymaga stosunkowo dużo materiału biologicznego i nie pozwala na przeprowadzenie analizy zdegradowanego DNA. Taki materiał dowodowy bardzo często jest jedynym materiałem dostępnym w sprawach kryminalistycznych. Poza tym analiza Jeffreys'a jest również bardzo czasochłonna i kosztochłonna. Pierwszy raz analiza DNA przeprowadzona tą metodą została wykorzystana w sądzie w sprawie Colina Pitchforka skazanego za zabójstwo i gwałt dwóch nastolatków. Jednocześnie w tej samej sprawie uniewinniono mężczyznę, który wcześniej był niesłusznie oskarżony [5].

Począwszy od 2008 roku podjęto międzynarodowy konsorcjalny projekt poznania 1000 ludzkich genomów (1000 Genomes Project Consortium) [6]. Projekt ten jest sukcesywnie poszerzany o analizę kolejnych genomów. Celem projektu jest zrozumienie i poznanie ludzkiego DNA, korelacja między genotypem a fenotypem, zgromadzenie informacji w bazach danych, udoskonalanie technik wykorzystywanych w analizach, z uwzględnieniem kwestii etycznych, społecznych oraz prawnych. Projekt ten przyczynił się do poznawania nowych markerów, jakimi są polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) oraz polimorfizmy insercyjno-delecyjne (InDel), co umożliwiło ich wykorzystywanie w genetyce sądowej [3, 6, 7].

Projekt sekwencjonowania ludzkich genomów do 2015 roku ukazał istnienie 84,7 mln polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP), 3,6 mln krótkich insercji bądź delecji (InDel) oraz 60 tys. innych wariacji. Badania zostały przeprowadzone na 2 504 osobach z 26 różnych populacji z użyciem najnowszych technik [8].

Konstruowanie baz danych DNA stało się jednym z ważniejszych elementów w zakresie badań identyfikacyjnych. Dzięki temu możliwa jest szybsza identyfikacja przestępców, poszukiwanie osób zaginionych oraz międzynarodowa współpraca. Zbierane są profile DNA złożone z markerów regionów krótkich tandemowych powtórzeń typu STR (Short Tandem Repeat), które w większości nie są regionami

kodującymi, są natomiast bardzo dobrze wystandaryzowane w aspekcie technik i zakresów badawczych [3].

1.2 Polimorfizmy genetyczne wykorzystywane w badaniach identyfikacyjnych

W ludzkim genomie znajduje się wiele sekwencji DNA, które się powtarzają, większość tych sekwencji spotykamy w intronach, czyli fragmentach genów, które nie kodują informacji fenotypowej. Sekwencje repetytywne są zróżnicowane pod względem długości jednostki powtarzanej oraz ilości powtarzanych jednostek [9]. Długie powtarzane jednostki mogą mieć nawet od kilkuset do kilku tysięcy par zasad. Takie długie jednostki są zwykle nazywane satelitarnym DNA i znajdują się w pobliżu centromerów [9]. Średniej długości jednostka repetytywna, która stanowi od 8 do 100 powtarzanych par zasad nazywana jest mini-satelitą, bądź regionem VNTR [9].

Polimorfizmy krótkich powtórzeń tandemowych to mikrosatelity (STRs), czy też proste powtórzenia sekwencyjne (SSRs). Występują one głównie w części niekodującej genomu człowieka, zarówno w obrębie 22 autosomów oraz 2 chromosomów płci. Mają jednostki repetytywne stanowiące od 2 do 7 par zasad, wielkość ich cząsteczek mieści się zazwyczaj od 50 do 300 par zasad [9,10].

Liczba powtarzanych jednostek może różnić się pomiędzy poszczególnymi osobami. Polimorfizmy te oznaczane są z zastosowaniem techniki PCR oraz elektroforezy w systemie detekcji fluorescencyjnej [9]. Kilkadziesiąt regionów typu STR może być wykorzystywane w analizach z zakresu genetyki sądowej [10]. Ich znaczenie w tej dziedzinie jest kluczowe, ponieważ sekwencje STR są podstawą baz danych profili DNA [11]. Dzięki daleko posuniętej standaryzacji zakresów i technik analizy STR, możliwe jest porównywanie wyników uzyskanych w odrębnych laboratoriach [10].

Polimorfizmy krótkich tandemowych powtórzeń w zależności od ilości powtórzeń modułu repetytywnego dzielimy na: di-, tri-, tetra-, czy pentanukleotydowe powtórzenia. W identyfikacji genetycznej największe znaczenia mają tetranukleotydowe jednostki repetytywne. Polimorfizmy te tworzą różne kategorie: proste powtórzenia zawierające identyczne sekwencje powtarzalne, złożone powtórzenia zawierające dwa lub więcej sąsiadujących prostych powtórzeń, kompleksowe powtórzenia składające się z kilku jednostek repetytywnych różnej długości oraz sekwencji, hiperzmiennie złożone

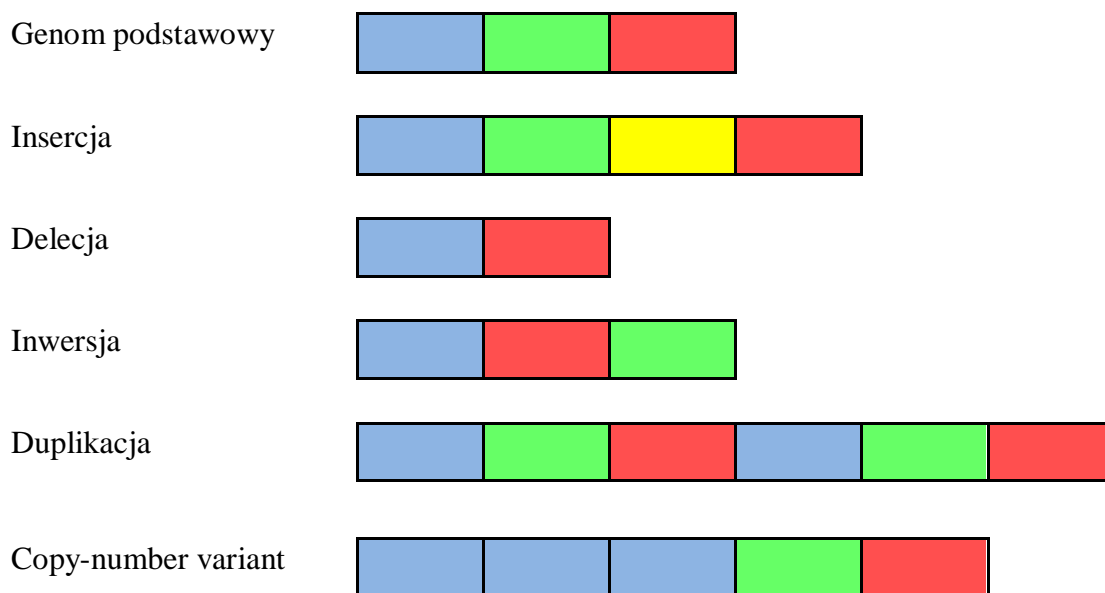
powtórzenia. Ostatnia kategoria nie jest wykorzystywana w badaniach genetycznych w związku z kłopotami z nazewnictwem oraz rozbieżnością pomiarów w laboratoriach. Istnieją również mikrowarianty, w których występują niekompletne jednostki repetytywne [9].

W badaniach z dziedziny genetyki sądowej wykorzystywane są STR-y głównie o rozmiarze 100-400 par zasad. Siła dyskryminacji jest bardzo duża szczególnie, gdy analizie poddawanych jest kilkanaście loci jednocześnie, wysoka jest również czułość badania. Kolejną zaletą badań regionów STR jest ich stosunkowo niski koszt, oraz łatwość analizy [10]. Do analizy zdegradowanego DNA wykorzystuje się miniSTR-y, dla których uzyskujemy zredukowane rozmiarowo amplikony. Tetranukleotydowe powtórzenia są najpopularniejszymi markerami, którymi zajmuje się genetyka sądowa. Istnieje aż 256 możliwych kombinacji 4 zasad azotowych w tych powtórzeniach [9].

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu oznaczany skrótem SNP (ang. single nucleotide polymorphism) jest to zmiana pojedynczego nukleotydu w sekwencji DNA powstała na skutek mutacji. SNP-y są wynikami błędów replikacji DNA podczas mejozy. To zjawisko jest dość powszechne w ludzkim DNA, SNP-y można je znaleźć w regionach kodujących oraz niekodujących. Część z nich koduje informacje genetyczną decydującą o fenotypie, np. o kolorze oczu, włosów, skóry. Produkty reakcji PCR regionów SNP mogą stanowić nawet poniżej 100 par zasad, dzięki temu są one bardziej odporne na degradację [10]. Nie obserwujemy produktów typu „stutter”, tj. amplikonów, które są zazwyczaj o jedno powtórzenie krótsze od prawdziwego allele i utrudniają interpretację wyników analizy [11]. Możliwe są również badania określające pochodzenie osoby z określonej populacji i regionu na podstawie zestawu markerów typu SNP. Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów są głównie bialleliczne, co oznacza w praktyce występowanie dwóch możliwych alleli oraz trzech możliwych genotypów (dwie homozygoty oraz jedna heterozygota). Problemów może nastręczać interpretacja zanieczyszczonego DNA. SNP-y są znacznie mniej informatywne od STR-ów, dlatego też wymagana jest analiza znacznie większej ich liczby aby uzyskać porównywalną wartość dowodową. Profil DNA odpowiadający wartości dowodowej 13-15 STR-ów uzyskujemy w zakresie 25-45 SNP-ów. Mutacje występują w tych polimorfizmach znacznie rzadziej niż w STR-ach, tj., 1 raz na ok. 100 000 000. Badania SNP stały się przedmiotem zainteresowań wielu naukowców, kilkadziesiąt milionów

odkrytych polimorfizmów zostało już opisanych i znalazło się w bazach danych [12]. Tym niemniej analiza SNP-ów jest bardziej czasochłonna i kosztowniejsza niż analiza STR-ów [10].

Polimorfizmy typu Copy Number Variants (CNVs) nazywane również polimorfizmami liczby kopii (ang. copy number polymorphisms) są kolejną poznaną zmiennością w obrębie ludzkiego DNA. Polimorfizm ten może powstać w wyniku inwersji, duplikacji, delecji bądź nawet przeniesienia części informacji genetycznej do innego regionu w genomie [13]. Polimorfizmy te zaprezentowano również w sposób graficzny na rycinie 1. Z regionami CNV związane mogą być określone cechy fenotypowe czy też choroby na skutek wystąpienia duplikacji czy większych delecji [14]. CNV-y stanowią około 12% genomu człowieka. Badania pokazują, że najczęściej w genomie występują małe delecje i duplikacje (poniżej 20 kb) [14]. Na rycinie 1 przedstawiono schemat polimorfizmów w zakresie zmiennej liczby kopii w genomie (CNVs). Zaprezentowany jest tutaj model insercji (wstawienie dodatkowej sekwencji), delecji (usunięcie sekwencji), inwersji (przestawienie sekwencji), duplikacji (powtórzenia sekwencji) oraz copy-number variant (wielokrotnego powtórzenia danej sekwencji obecnej w genomie podstawowym).



Rycina 1. Schemat przedstawiający strukturę polimorfizmów w zakresie zmiennej liczby kopii w genomie (CNVs).

CNV-y, które mają małe rozmiary oraz ich warianty w zakresie zmiennej liczby kopii, które obejmują tylko insercję bądź delecję nazywane są polimorfizmami insercyjno-delecyjnymi w skrócie InDel (Insertion Deletion Polymorphism) czy też DIP (Deletion Insertion Polymorphism).

1.3 Badania w zakresie markerów insercyjno-delecyjnych

Polimorfizmy genetyczne, w tym również polimorfizmy insercyjno-delecyjne mogą być wykorzystywane do badania pokrewieństwa, w tym ojcostwa, badania osób zaginionych, identyfikacji szczątków osób zmarłych (ofiar pożarów, eksplozji, wypadków drogowych, katastrof naturalnych oraz spowodowanych działaniem człowieka) [7, 15-18].

Już z pojedynczej komórki możliwa jest identyfikacja DNA ludzkiego, a piętnaście komórek wystarczy, aby uzyskać dobrej jakości profil genetyczny w standardowych warunkach. Materiał do badań stanowią komórki, które zawierają ludzkie DNA: krew, włosy, fragmenty tkanek (np. naskórek), płyny z jam ciała, wydzieliny (ślina, nasienie) oraz wydaliny (mocz, kał).

Polimorfizmy genetyczne można również wykryć w materiale, który uległ już znacznemu rozkładowi (kości, zęby, zaparafinowane tkanki). Możliwa jest identyfikacja osoby w oparciu o badanie produktów codziennego użytku: szczoteczki do zębów, szminki bądź niedopałków papierosów. W badaniach genetyczno-sądowych pomocne są również badania DNA roślin i zwierząt, które mogą być przydatne w powiązaniu sprawcy z ofiarą czy też miejscem zdarzenia kryminalnego [16, 18-21].

Kolejnym zastosowaniem analizy zmienności jest identyfikacja pochodzenia biogeograficznego, ponieważ określone populacje wykazują podobną dystrybucję określonych zestawów cech DNA [7, 15-18].

1.4 Badania w zakresie markerów insercyjno-delecyjnych

Polimorfizmy insercyjno-delecyjne nazywane inaczej InDel bądź DIP są polimorfizmami, w których dana sekwencja jest wstawiana albo wycinana. W genomie człowieka stanowią one około 15-20% wszystkich do tej pory odkrytych polimorfizmów. Około 36% znajduje się w egzonach, promotorach i intronach genów.

Istnieje kilka podziałów polimorfizmów insercyjno-delecyjnych: insercje/delecje pojedynczej pary zasad, monomeryczne rozbudowane pary zasad, składające się z 2-15 powtórzeń par zasad, insercje transpozonów, zawarcie różnych sekwencji DNA w przedziale 2-29989 długości par zasad. Znakomita część polimorfizmów należy do ostatniej klasy, przy czym prawie wszystkie (99%) zawierają sekwencje insercyjno-delecyjne poniżej 100 par zasad. Genetyka sądowa wykorzystuje polimorfizmy, których długość wynosi do 160 par zasad, a element delecyjno/insercyjny stanowi od 4 do 22 par zasad [22].

Insercje/delecje pojedynczej pary zasad stanowią blisko 30% wszystkich polimorfizmów [22]. Położenie InDel jest wyznaczone przez numer HLD (human locus deletion/ insertion polymorphism), który koreluje z numerem RefSNP (rs) [22, 23]. Istotnym aspektem w identyfikacji genomu ludzkiego jest wybór odpowiednich markerów. Do badań wykorzystywane są polimorfizmy bialleliczne oddalone od siebie o przynajmniej 10 Mbp (100 000 000 bp), z odpowiednią siłą wykluczenia, niekodujące [17]. Cechami pozwalającymi stosować je w badaniach są zmniejszone rozmiary amplikonów, dzięki czemu mogą być analizowane próbki ze zdegradowanym materiałem, prosta analiza dzięki wykorzystaniu techniki PCR oraz detekcji przy pomocy elektroforezy kapilarnej [17,24]. Kolejną zaletą tych polimorfizmów jest to, że jest możliwość wykrycia wielu z nich jednocześnie (multiplex) oraz mają niski współczynnik mutacji ($<2 \times 10^{-9}$) [7]. Dzięki temu doskonale nadają się do badań z dziedziny genetyki sądowej. Ilość etapów analizy, jakie trzeba przejść, aby otrzymać wynik jest niewielka, a koszt badań stosunkowo mały [17]. W otrzymanym wyniku nie ma mikrowariantów oraz produktów PCR typu „stutter” [25]. Pełny profil genetyczny możliwy jest do uzyskania przy ilości 63 pg DNA, natomiast optymalna ilość DNA stanowi 0,2-0,5 ng [21]. W tabeli 1 przedstawiono parametry 30 polimorfizmów insercyjno-delecyjnych w tym: numer w zestawie, chromosom, położenie w chromosomie, motyw insercyjny/delecyjny, numer dbSNP. Polimorfizmy insercyjno-delecyjne mają również wady: nie wszystkie są informatywne dla populacji, zanieczyszczenie próbki i zbyt duża ilość DNA, tj. powyżej 1 ng może spowodować trudności w analizie, a tym samym generować błędny wynik [18, 26].

Kit No.	Chromosom	położenie	dbSNP identyfikator	Położenie w chr.	Motyw
HLD77	7	110,727,223	rs1611048	7q31.1	TAAG
HLD45	2	169,898,519	rs2307959	2q31.1	CACG
HLD131	7	154,035,495	rs1611001	7q36.2	TGGGCTTATT
HLD70	6	97,564,842	rs2307652	6q16.1	AGCA
HLD111	17	16,025,713	rs1305047	17p11.2	CACA
HLD6	16	54,249,331	rs1610905	16q13	GCA GGA CTGGG CACC
HLD58	5	76,780,823	rs1610937	5q14.1	AGGA
HLD56	4	108,109,222	rs2308292	4q25	TAA GT
HLD118	20	25,226,470	rs16438	20p11.1	CCCCA
HLD92	11	101,984,628	rs17174476	11q22.2	GTTT
HLD93	12	93,200,037	rs2307570	12q22	ACTTT
HLD99	14	57,119,834	rs2308163	14q23.1	TGAT
HLD88	9	98,037,732	rs8190570	9q22.32	CCACACAAAGA
HLD101	15	87,665,320	rs2307433	15q26.1	GTAG
HLD67	5	155,594,834	rs1305056	5q33.2	CTACTGAC
HLD136	22	35,739,831	rs16363	22q13.1	TGTTT
HLD133	3	41,111,225	rs2067235	3p22.1	CAACCTGGATT
HLD97	13	30,226,384	rs17238892	13q12.3	AGAGAAAGCTGAAG
HLD40	1	54,490,780	rs2307956	1p32.3	GGGACAGGTGGCCACTAGGAGA
HLD128	1	193,144,970	rs2307924	1q31.3	ATTAATA
HLD39	1	92,010,480	rs17878444	1p22.1	CCTAAACAAAAATGGGAT
HLD84	8	120,016,982	rs3081400	8q24.12	CTTC
HLD83	8	19,134,059	rs2308072	8p22	AAGG
HLD114	17	3,916,882	rs2307581	17p13.3	TCCTATTCTACTCTGAAT
HLD48	2	99,447,993	rs28369942	2q11.2	GACTT
HLD124	22	34,031,900	rs6481	22q12.3	GTGGA
HLD122	21	33,582,626	rs8177524	21q22.11	GAAGTCTGAGG
HLD125	22	24,080,816	rs16388	22q11.23	ATTGCC
HLD64	5	66,250,256	rs1610935	5q12.3	GACAAA
HLD81	7	94,885,086	rs17879936	7q21.3	GTAAGCATTGT

Tabela 1. Charakterystyka wykorzystanych w pracy polimorfizmów insercyjno-delecyjnych opracowana na podstawie [30]

Markery InDel mogą stanowić uzupełniającą metodę oznaczeń do polimorfizmów STR, szczególnie, gdy konieczne jest poszerzenie zakresu badań lub mamy do czynienia z niskocząsteczkowym DNA [27].

Do badania polimorfizmów insercyjno-delecyjnych wykorzystywany jest w zakresie genetyki sądowej m. in. zestaw Investigator DIPplex (Qiagen, Niemcy). Ten zestaw pozwala jednocześnie analizować 30 biallelicznych markerów typu InDel

rozmieszczonych na ponad 19 autosomach oraz amelogeninę - gen, który ma zastosowanie w identyfikacji płci.

2 Cele pracy

Celem pracy jest analiza populacyjna oraz ocena przydatności zestawu Investigator DIPplex (Qiagen) zawierającego 30 loci typu InDel: HLD6, HLD39, HLD40, HLD45, HLD48, HLD56, HLD58, HLD64, HLD67, HLD70, HLD77, HLD81, HLD83, HLD84, HLD88, HLD92, HLD93, HLD97, HLD99, HLD101, HLD111, HLD114, HLD118, HLD122, HLD124, HLD125, HLD128, HLD131, HLD133, HLD136 w badaniach genetyczno-sądowych w centralnej Polsce. Poszczególnymi składowymi pozwalającymi zrealizować wyżej wymieniony cel są:

I. Analiza rozkładów alleli w pełnym zakresie markerów zestawu Investigator DIPplex oraz porównanie otrzymanych wyników z innymi populacjami Polski, Europy i świata.

II. Analiza międzypopulacyjna oparta na genetycznym oszacowaniu stopnia pokrewieństwa genetycznego pomiędzy populacją centralnej Polski a innymi populacjami z całego świata.

III. Ocena przydatności do badań i wartości dowodowej poszczególnych markerów oraz całego multipleksu w oparciu o wyliczone parametry statystyczne oraz ocena współczynnika wsobności.

IV. Weryfikacja praktycznej przydatności zestawu Investigator DIPplex w oparciu o analizę spraw dochodzenia ojcostwa przeprowadzanych w Pracowni Genetyki Medycznej i Sądowej z podziałem na ekspertyzy wykluczające i potwierdzające ojcostwo.

3 Materiał i metodyka

3.1 Materiał

Materiał badawczy stanowiły wymazy z wewnętrznej strony policzka. Został on pobrany od 80 niespokrewnionych osób, w tym od 38 kobiet i 42 mężczyzn, urodzonych w województwie łódzkim centralnej Polski, uczestniczących w 43

sprawach spornego ojcostwa, przeprowadzonych w Pracowni Genetyki Medycznej i Sądowej Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Na wykorzystanie próbek DNA w postaci wymazów do przedmiotowych analiz uzyskano zgodę badanych, bądź w przypadku osób niepełnoletnich zgodę ich opiekunów prawnych. Na wykorzystanie wyżej wymienionych materiałów do analizy i zestawień biostatystycznych uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy UM w Łodzi nr RNN/294/16KE z dnia 06.12.2016r.

3.2 Metodyka badań

Materiał genetyczny w postaci komórek nabłonka z wewnętrznej strony jamy ustnej uzyskano pobierając na jałowe wymazówki. Następnie do czasu izolacji materiał zabezpieczono w temperaturze -20°C. Czyste DNA do analiz uzyskano dzięki izolacji metodą kolumnkową z wykorzystaniem złożeń w postaci membran jonowymiennych z zestawu Sherlock AX, zgodnie z instrukcją producenta (A&A Biotechnology, Polska) [28].

Ocenę jakościową i ilościową wyizolowanego DNA dokonano za pomocą zestawu do reakcji real-time PCR - PowerQuant™ System firmy Promega zgodnie z protokołem producenta [29].

Multiplexowa reakcja łańcuchowej polimerazy została przeprowadzona w termocyklerze GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) przy użyciu zestawu Investigator DIPplex firmy Qiagen. Całkowita ilość mieszaniny amplifikacyjnej stanowiła 25 µl, przy czym zawierała 0,2-0,5 ng matrycowego badanego DNA oraz mieszaninę starterów specyficznych dla 30 loci autosomalnych: HLD6, HLD39, HLD40, HLD45, HLD48, HLD56, HLD58, HLD64, HLD67, HLD70, HLD77, HLD81, HLD83, HLD84, HLD88, HLD92, HLD93, HLD97, HLD99, HLD101, HLD111, HLD114, HLD118, HLD122, HLD124, HLD125, HLD128, HLD131, HLD133, HLD136 oraz genu odpowiedzialnego za identyfikację płci-amelogeniny (AMG). Cała procedura została przeprowadzona zgodnie z zaleceniem producenta [30].

Detekcja polimorfizmów insercyjno-delecyjnych została przeprowadzona przy pomocy elektroforezy kapilarnej oraz detekcji pięciokolorowej fluorescencyjnej w sekwenatorze 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, USA) w odniesieniu do wzorca wielkości BTO (BT5) i wzorca alleli DNA (Allelic Ladder) dostarczonych

przez producenta. Analiza DNA odbyła się przy użyciu oprogramowania GeneMapper ID-X wersja v.1.2 (Thermo Fisher Scientific, USA) [30]. W celu potwierdzenia prawidłowo wykonanego badania, analizę przeprowadzano w obecności kontroli ujemnej oraz dodatniej zgodnie z zaleceniami Komisji Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej (ISFG) [31-33].

3.3 Analiza statystyczna polimorfizmów insercyjno-delecyjnych

Prawo Hardy'ego i Weinberga służy do oceny pomiędzy uzyskanym rozkładem genotypów a rozkładem alleli. Jeżeli obserwowana częstość genotypów jest zbliżona do oczekiwanej częstości genotypów wyliczonej na podstawie obserwowanej częstości alleli to populacja znajduje się w stanie równowagi Hardy'ego i Weinberga. Stan równowagi jest charakterystyczny dla populacji o dużej liczebności, w której następuje kojarzenie losowe oraz nie zachodzą mutacje [34, 35]. Gdy dwa allele oznaczymy jako B i b, a ich częstość f_B i f_b to otrzymamy trzy możliwe genotypy: BB, Bb, bb. Przy takich założeniach w populacji w stanie równowagi są następujące założenia:

$$f_B + f_b = 1 \qquad (f_B + f_b)^2 = f_B^2 + 2 f_B f_b + f_b^2$$

Oprogramowanie GDA wykorzystano do oceny stanu równowagi Hardy'ego i Weinberga z wykorzystaniem dokładnego testu Fishera. Wyniki dokładnego testu Fishera z porównania rozkładów oczekiwanego i obserwowanego genotypów generujące poziom prawdopodobieństwa $p \geq 0,05$ mówią o braku statystycznie zmiennych różnic pomiędzy powyższymi rozkładami w populacji badanej. Gdy poziom prawdopodobieństwa wynosi $p < 0,05$, to wskazuje on na odstępstwa od równowagi Hardy'ego i Weinberga [36, 37]. Zastosowanie poprawki Bonferroniego przy wielokrotnych porównaniach modyfikuje poziom istotności lub wartość prawdopodobieństwa [38].

Wskaźnik wsobności (inbredu) oznaczany symbolem ϕ (theta) wskazuje na określoną ilość wspólnych przodków w populacji. Można go obliczyć korzystając z heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej. Przedział jego wartości znajduje się w granicach od -1 do 1. Wartości dodatnie wskazują na występowanie w populacji przewagi homozygot co może świadczyć o występowaniu subpopulacji. Wartości ujemne mówią o nadmiarze heterozygot, które mogą być spowodowane występowaniem rzadkich alleli. Wartość 0 oznacza równowagę Hardy'ego i Weinberga [39, 40].

Do analizy parametrów użyteczności markerów uzyskanych zestawem Investigator DIPplex wykorzystano oprogramowania biostatystyczne: PowerMarker wersja v. 3.25 [41], GDA (Genetic Data Analysis) wersja v. 1.0 [37, 42] i arkusz Power Stats wersja v.1.2 [43]. Obliczono następujące parametry przydatności:

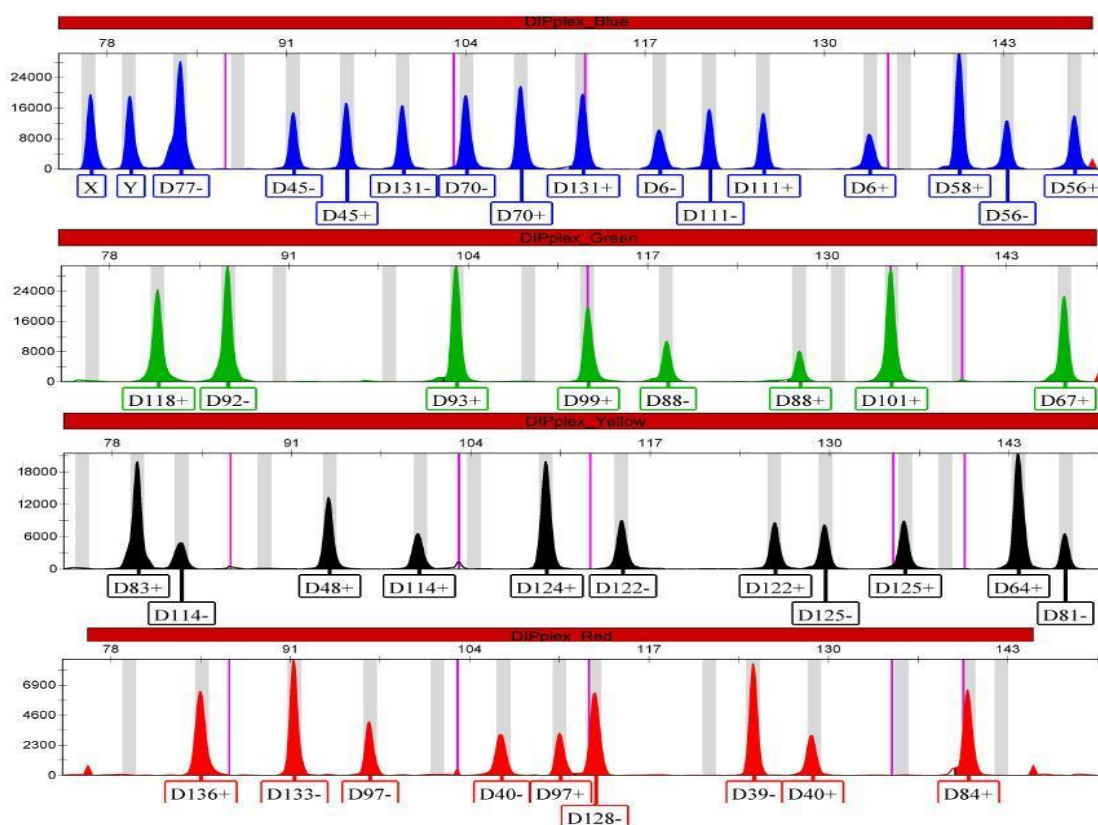
- ✓ Liczba alleli- Allele No. (ang. Allele Number)
- ✓ Częstość głównego allela- MAF (ang. Major Allele Frequency)
- ✓ Heterozygotyczność- HET (ang. Heterozygosity), która odpowiada heterozygotyczności obserwowanej- HET_{obs}
- ✓ Zmienność genowa- GD (ang. Gene Diversity)
- ✓ Prawdopodobieństwo zgodności- MP (ang. Matching Probability), tj. prawdopodobieństwo powtórzenia się profilu DNA w populacji.
- ✓ Siła dyskryminacji- PD (ang. Power of Discrimination), tj. prawdopodobieństwo, że dwie losowo wybrane osoby z populacji nie będą miały takiego samego profilu DNA.
- ✓ Siła wykluczenia- PE (ang. Power of Exclusion)
- ✓ Typowy indeks ojcostwa- TPI (ang. Typical Paternity Index)
- ✓ Wskaźnik informacji o polimorfizmie- PIC (ang. Polymorphism Information Content)

Przeprowadzono także analizę dystansów genetycznych porównując badaną populację centralnej Polski z wybranymi populacjami Europy i świata. Macierz odległości genetycznych opracowano zgodnie z algorytmem podanym przez Reynolds i wsp. [40] w programie Power Marker wersji v. 3.25 [41]. Kolejnym etapem było zobrazowanie dystansów opartych o uzyskaną macierz w programie GDA wersja v.1.0 [37] korzystając z programu TreeView [44]. Otrzymane rozkłady alleli populacji centralnej Polski porównano z rozkładami populacji Europy i świata, aby tego dokonać skonstruowano radialne drzewo dystansów genetycznych. Dodatkowo dla lepszego zwizualizowania odległości pomiędzy poszczególnymi populacjami wykonano skalowanie wielowymiarowe w programie STATISTICA wersja v.12.5 [45].

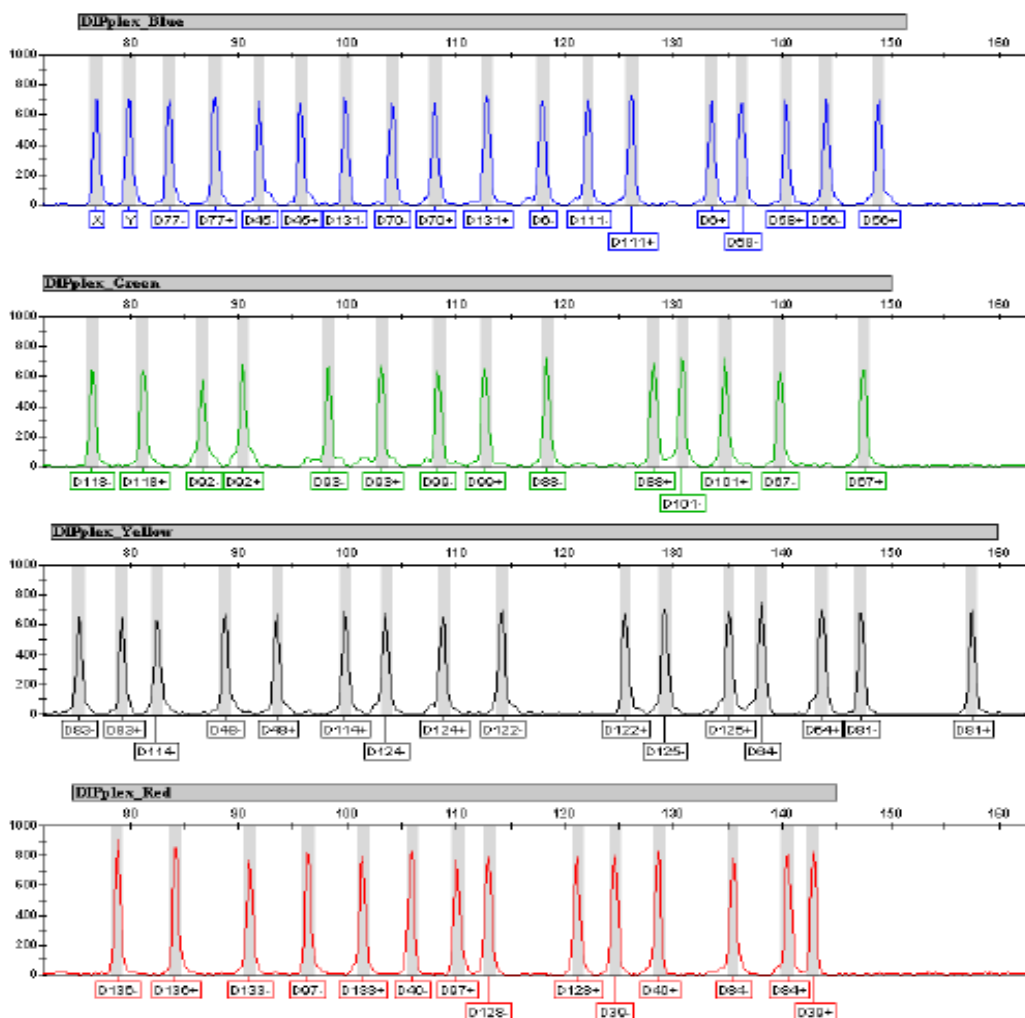
4 Wyniki badań

4.1 Analiza populacyjna i porównawcza

Rozkłady uzyskane od 80 niespokrewnionych osób obu płci urodzonych na terenie województwa łódzkiego Polski Centralnej posłużyły do wykonania badania populacyjnego rozkładu 30 markerów InDel wchodzących w skład multipleksu Investigator DIPplex firmy Qiagen. Kolejnym etapem analizy było porównanie z innymi wybranymi populacjami Europy i świata. Na rycinie 2 pokazany jest przykładowy profil DNA jednej z badanych osób. Uzyskany on został w odniesieniu do wzorca InDel przedstawionego na rycinie 3.

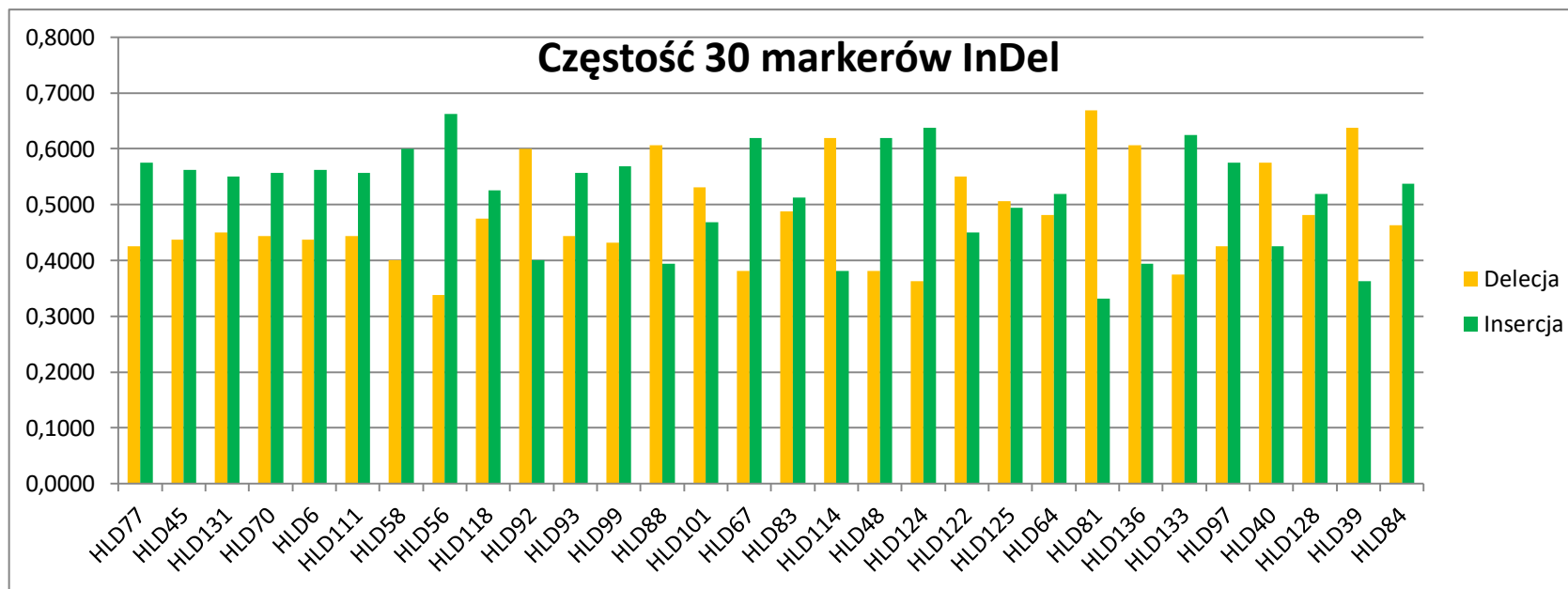


Rycina 2. Wyniki badań polimorfizmu insercyjno-delecyjnego w zakresie 30 układów wchodzących w skład multipleksu Investigator DIPplex (Qiagen) znakowanych czterema barwnikami fluorescencyjnymi uzyskane dla przykładowego mężczyzny.



Rycina 3. Wzorec polimorfizmów insercyjno-delecyjnych w obrębie 30 markerów autosomalnego DNA oraz genu amelogeniny z zestawu Investigator DIPplex (Qiagen) znakowany czterema barwnikami fluorescencyjnymi.

Na rycinie 4 zaprezentowano częstość markerów insercyjno-delecyjnych w populacji regionu łódzkiego reprezentowanej przez 80 niespokrewnionych osób. Populację centralnej Polski, stanowiącą jedną z najbardziej jednolitych populacji rasy kaukaskiej w Europie, porównano z innymi populacjami Europy, dla których były dostępne dane obejmujące komplet 30 markerów InDel wchodzących w skład zestawu Investigator DIPplex, tj.: Polski, Danii, Niemiec, Litwy, Finlandii, Słowenii, Czech, Portugalii, północno-wschodnich Włoch, Turcji, Hiszpanii (w tym również populacji kraju Basków), Iraku, Ameryki Północnej (populacja Afroamerykanów), Urugwaju, Brazylii, Somalii, Tajwanu, Południowej Korei, Tybetu, Chin, oraz Węgier (jedynie dla tej ostatniej populacji brakuje danych dla układów HLD6, HLD136) [7, 16, 17, 23, 25, 26, 27, 46-55].



Rycina 4. Częstość występowania insercji/delecji 30 markerów InDel multipleksu Investigator DIPlex w próbie populacyjnej liczącej 80 niespokrewnionych osób z badanego regionu łódzkiego Polski Centralnej

Marker	PL-ŁÓDŹ	POLSKA	DANIA	PORTUGALIA	LITWA	SŁOWENIA	FINLANDIA	WŁOCHY	AFRO-USA	URUGUJAJ	BRAZYLIA	SOMALIA	IRAK	TAJWAN	PD KOREA	TYBET	CHINY1	CHINY2	TURCJA	HISZPANIA	PD-BRAZYLIA	NIEMCY
POZ. PIŚM.	-	46	16	7	48	48	55	49	17	50	51	55	48	46	52	27	27	53	48	25	23	47
Liczba os. INS (2)	80	122	117	108	110	157	151	200	260	131	519	175	101	126	373	226	210	236	93	71	108	80
HLD77	0,5750	0,5779	0,6068	0,4444	0,5909	0,6019	0,5331	0,4425	0,3788	0,6145	0,4306	0,2771	0,3911	0,4921	0,4611	0,4889	0,4952	0,4640	0,5914	0,4014	0,4352	0,5625
HLD45	0,5625	0,5328	0,5043	0,5463	0,5273	0,5478	0,5132	0,4975	0,4154	0,4695	0,4778	0,3486	0,6337	0,6746	0,5898	0,6681	0,5786	0,6525	0,6667	0,5352	0,4352	0,5688
HLD131	0,5500	0,6189	0,5256	0,5602	0,6000	0,5828	0,5662	0,5825	0,7654	0,4695	0,5713	0,6314	0,5495	0,2937	0,3606	0,4425	0,3357	0,3347	0,4785	0,5000	0,5093	0,5438
HLD70	0,5563	0,5000	0,5000	0,5509	0,5045	0,5382	0,5132	0,5450	0,8712	0,3397	0,6503	0,7943	0,5891	0,6587	0,6340	0,5841	0,5857	0,5636	0,5914	0,6127	0,5602	0,5188
HLD6	0,5625	0,5492	0,5256	0,4583	0,5864	0,5127	0,5795	0,4775	0,4038	0,4160	0,4740	0,3257	0,4752	0,5238	0,4316	0,4978	0,4690	0,4682	0,4892	0,5070	0,5556	0,5500
HLD111	0,5563	0,5246	0,5385	0,5602	0,5364	0,5478	0,5331	0,5825	0,3750	0,4885	0,4730	0,3657	0,5941	0,1667	0,0724	0,0752	0,0929	0,0911	0,5161	0,5000	0,4630	0,4938
HLD58	0,6000	0,4262	0,5641	0,4769	0,5909	0,5573	0,5199	0,4875	0,1673	0,5458	0,3507	0,3286	0,4109	0,4365	0,3324	0,2898	0,3381	0,4025	0,4839	0,5423	0,3889	0,5125
HLD56	0,6625	0,6680	0,6496	0,7269	0,6455	0,6274	0,6159	0,6350	0,5404	0,4351	0,6397	0,7371	0,6832	0,6190	0,5282	0,6217	0,5286	0,5508	0,7473	0,7535	0,6389	0,6563
HLD118	0,5250	0,4098	0,4573	0,3981	0,4682	0,4586	0,3609	0,4375	0,2942	0,6069	0,3796	0,5143	0,3564	0,9048	0,9504	0,9137	0,9143	0,9555	0,3441	0,4155	0,4167	0,4375
HLD92	0,4000	0,4180	0,4701	0,4583	0,4045	0,3981	0,4139	0,4600	0,3038	0,5878	0,4489	0,3857	0,5050	0,4683	0,4209	0,4226	0,4714	0,4555	0,4839	0,4859	0,5185	0,4500
HLD93	0,5563	0,5369	0,6068	0,4769	0,4591	0,5255	0,6093	0,5450	0,4923	0,4198	0,5780	0,4886	0,4604	0,5794	0,6059	0,5973	0,6024	0,5593	0,4624	0,5070	0,5890	0,5500
HLD99	0,5688	0,5943	0,5684	0,5741	0,6409	0,5764	0,7417	0,5450	0,6058	0,3779	0,5626	0,7400	0,6485	0,8413	0,9142	0,8009	0,8762	0,8644	0,5914	0,5986	0,5509	0,5188
HLD88	0,3938	0,4303	0,4701	0,5000	0,5091	0,4172	0,4801	0,5250	0,6750	0,4046	0,5636	0,8200	0,5990	0,5476	0,5080	0,6372	0,5524	0,5530	0,5484	0,4225	0,5324	0,4438
HLD101	0,4688	0,5820	0,3675	0,4630	0,5364	0,4618	0,5331	0,4025	0,7673	0,4885	0,5193	0,8029	0,5000	0,4603	0,4330	0,4889	0,4976	0,4661	0,4516	0,5141	0,5046	0,5438
HLD67	0,6188	0,6066	0,5940	0,6296	0,6136	0,5860	0,5993	0,5775	0,6904	0,4275	0,5665	0,4314	0,5990	0,6587	0,6823	0,5996	0,6595	0,7542	0,5806	0,6268	0,5046	0,7000
HLD83	0,5125	0,4713	0,5556	0,5139	0,3773	0,4650	0,5199	0,5075	0,6077	0,5534	0,4355	0,5171	0,3911	0,4206	0,3968	0,2876	0,3810	0,3814	0,4194	0,5915	0,4954	0,3938
HLD114	0,3813	0,3115	0,3675	0,4213	0,4045	0,3599	0,3940	0,4100	0,7750	0,5916	0,5135	0,6371	0,4653	0,2857	0,2869	0,3208	0,3119	0,2352	0,3925	0,4859	0,3426	0,3688
HLD48	0,6188	0,5615	0,6795	0,5926	0,5818	0,5446	0,7086	0,5350	0,7212	0,4695	0,6782	0,6286	0,4158	0,3333	0,3767	0,4425	0,4024	0,4428	0,4140	0,5563	0,6296	0,5500
HLD124	0,6375	0,6393	0,5556	0,5833	0,6955	0,6561	0,5530	0,6900	0,2212	0,3588	0,5453	0,2086	0,5891	0,5357	0,5563	0,5332	0,5833	0,5826	0,5376	0,6479	0,6991	0,6250
HLD122	0,4500	0,4549	0,3803	0,3750	0,4182	0,4745	0,4934	0,5000	0,3635	0,5687	0,3979	0,2086	0,4851	0,1667	0,2627	0,3363	0,2738	0,2331	0,3817	0,4014	0,3981	0,3938
HLD125	0,4938	0,4221	0,5427	0,5417	0,4909	0,5191	0,5066	0,4125	0,2788	0,5420	0,3988	0,2429	0,4802	0,4762	0,3552	0,4513	0,3833	0,3517	0,4839	0,4648	0,4306	0,5563
HLD64	0,5188	0,5369	0,5812	0,5463	0,5000	0,5605	0,6126	0,6025	0,7769	0,3206	0,7119	0,6543	0,6485	0,8571	0,8552	0,8518	0,7976	0,8602	0,6505	0,5986	0,5833	0,5375
HLD81	0,3313	0,4426	0,4701	0,3935	0,4091	0,4554	0,5960	0,4300	0,5192	0,5611	0,5337	0,3543	0,4703	0,7222	0,8727	0,8496	0,8810	0,8305	0,4892	0,4225	0,5926	0,4938
HLD136	0,3938	0,4672	0,4957	0,5463	0,5045	0,4936	0,4834	0,5200	0,7788	0,4389	0,5472	0,7143	0,7129	0,4365	0,5818	0,5819	0,5738	0,5275	0,5161	0,5563	0,5185	0,4938
HLD133	0,6250	0,5123	0,6068	0,5278	0,5682	0,5223	0,5828	0,5425	0,3154	0,4580	0,4663	0,4600	0,3812	0,3571	0,3753	0,4226	0,3667	0,3623	0,4247	0,6268	0,4444	0,5438
HLD97	0,5750	0,4959	0,5299	0,4907	0,5773	0,5000	0,4735	0,5025	0,4096	0,4847	0,4884	0,3514	0,4851	0,3889	0,3298	0,2456	0,3262	0,3390	0,4194	0,5211	0,5185	0,5125
HLD40	0,4250	0,5041	0,4188	0,5231	0,4318	0,4650	0,3576	0,5175	0,7000	0,5267	0,4143	0,5200	0,4554	0,6429	0,6260	0,5619	0,6905	0,6737	0,5269	0,4085	0,4954	0,4188
HLD128	0,5188	0,4549	0,4316	0,4074	0,5045	0,4968	0,5927	0,4425	0,6577	0,5534	0,4981	0,5829	0,5248	0,3492	0,3472	0,3518	0,2905	0,3496	0,4624	0,4507	0,4954	0,4938
HLD39	0,3625	0,4180	0,2991	0,3935	0,3773	0,3694	0,3146	0,3875	0,5596	0,6031	0,4017	0,4543	0,4901	0,1746	0,1273	0,2279	0,1286	0,1165	0,4892	0,4014	0,4074	0,3875
HLD84	0,5375	0,5369	0,5171	0,6713	0,5000	0,5541	0,5232	0,5225	0,6115	0,4542	0,5886	0,8429	0,6287	0,7302	0,7560	0,7146	0,7167	0,7606	0,6290	0,6056	0,5463	0,5938

Tabela 2. Zestawienie częstości występowania insercji dla 30 markerów InDel multipleksu Investigator DIPlex w 22 populacjach niespokrewnionych osób z badanego regionu łódzkiego Polski Centralnej [7,16,17,23,25,27,46-53,55].

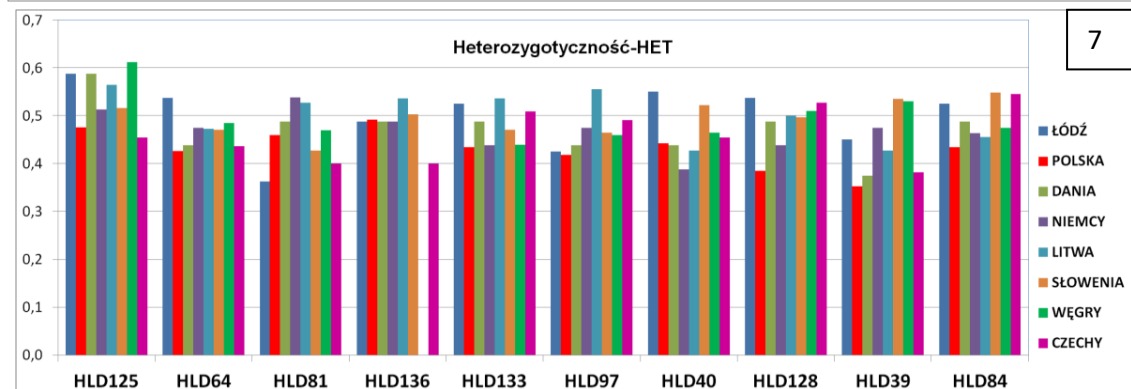
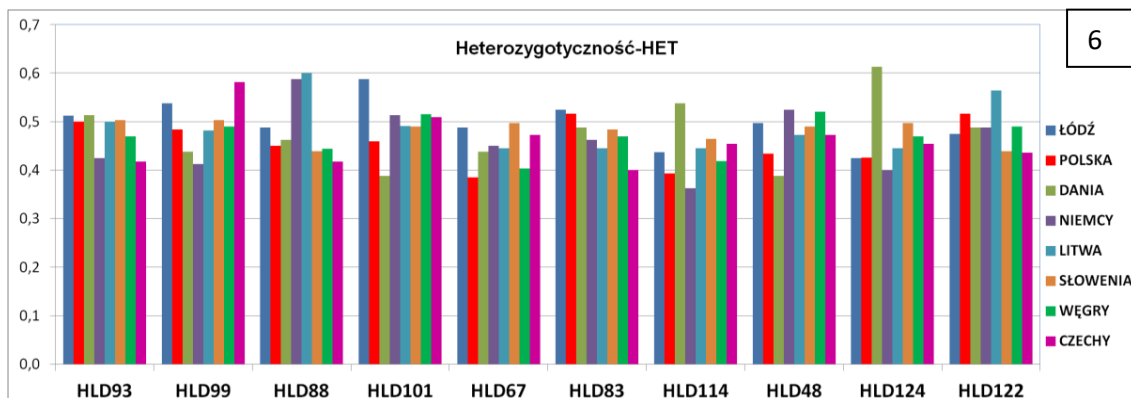
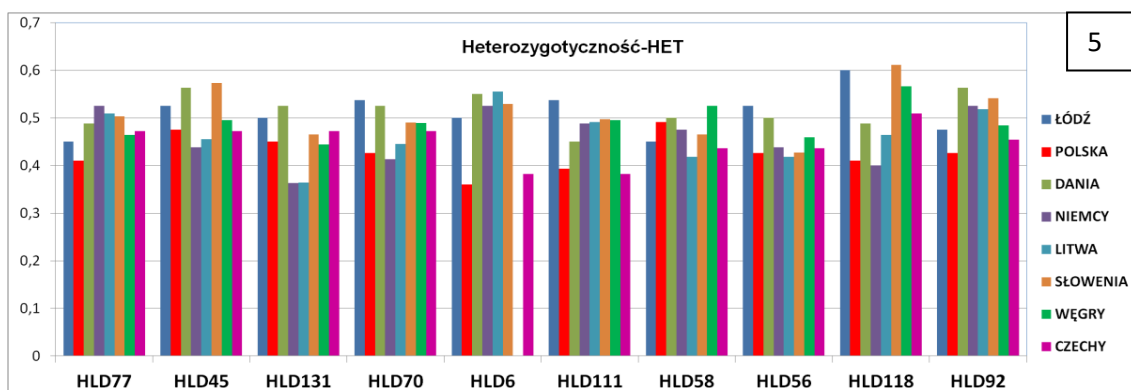
4.2 Analiza parametrów i przydatności

Rozkład cech genetycznych w próbie populacyjnej 80 niespokrewnionych osób regionu łódzkiego posłużył do obliczeń biostatystycznych, które składają się na charakterystykę badanej populacji, w tym również wartości prawdopodobieństwa do oceny równowagi Hardy’ego i Weinberga, współczynnika wsobności oraz parametrów przydatności każdego z badanych 30 markerów. Zestawienie obliczonych parametrów pokazuje tabela 3.

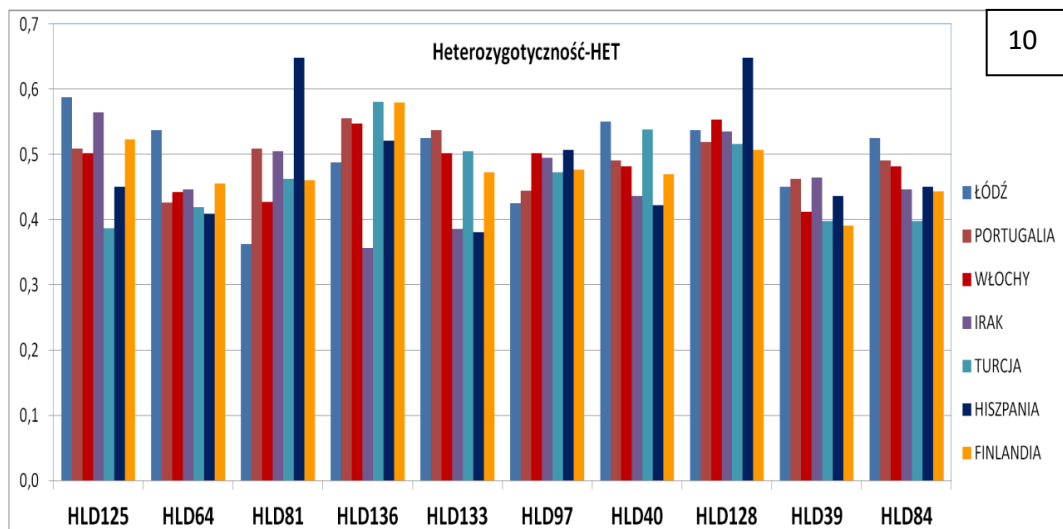
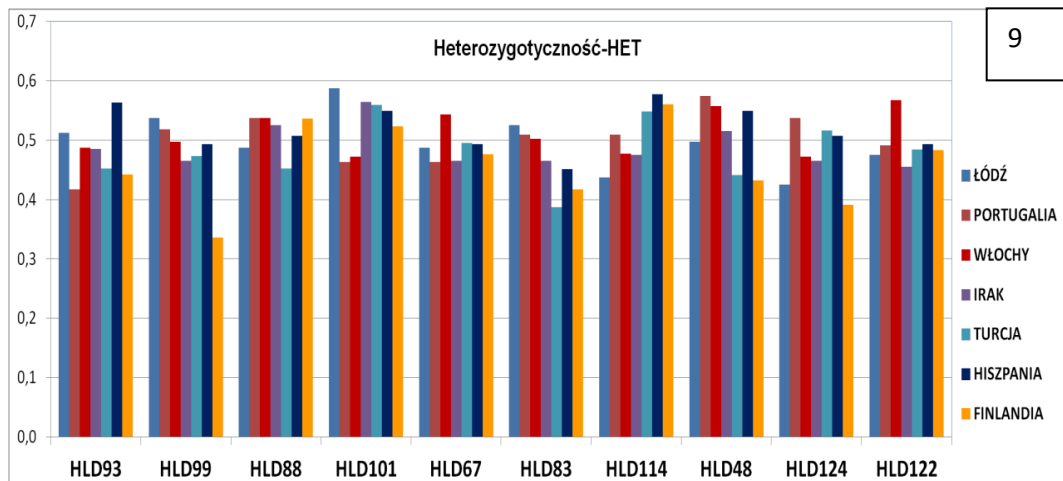
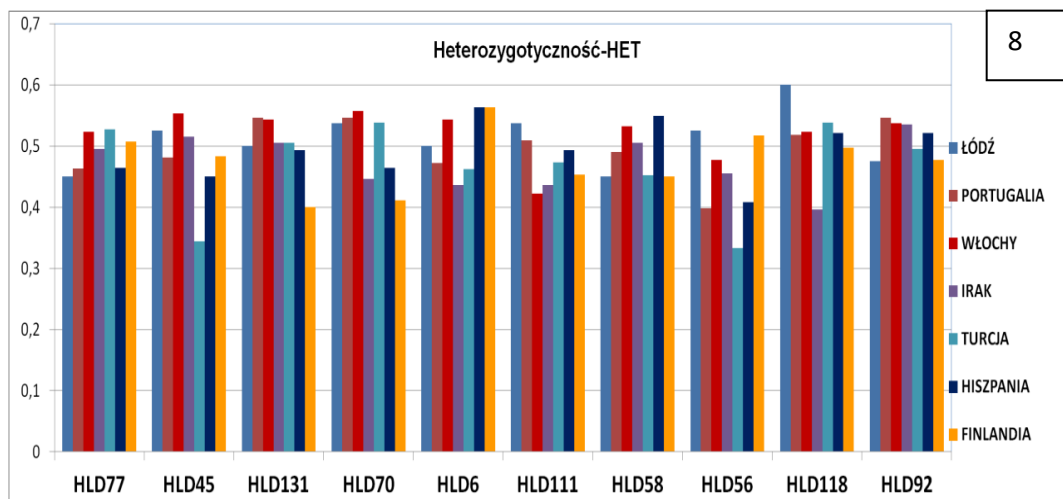
Locus	HLD77	HLD45	HLD131	HLD70	HLD6	HLD111	HLD58	HLD56	HLD118	HLD92	Locus
MAF	0,5750	0,5625	0,5500	0,5563	0,5625	0,5563	0,6000	0,6625	0,5250	0,6000	MAF
HET	0,4500	0,5250	0,5000	0,5375	0,5000	0,5375	0,4500	0,5250	0,6000	0,4750	HET
GD	0,4888	0,4922	0,4950	0,4937	0,4800	0,4472	0,4988	0,4800	0,4937	0,4905	GD
MP	0,3650	0,3960	0,3800	0,4020	0,3830	0,4020	0,3740	0,4410	0,4410	0,3830	MP
PD	0,3950	0,3190	0,2580	0,4640	0,3820	0,4610	0,2610	0,5060	0,4160	0,4250	PD
PE	0,3530	0,2830	0,3950	0,5260	0,4160	0,4500	0,4730	0,4980	0,2390	0,4270	PE
TPI	0,9100	1,0500	1,0000	1,0800	1,0000	1,0800	0,9100	1,0500	1,2500	0,9500	TPI
PIC	0,3693	0,3711	0,3725	0,3718	0,3711	0,3718	0,3648	0,3472	0,3744	0,3648	PIC
ϕ	0,0855	-0,0604	-0,0038	-0,0825	-0,0096	-0,0825	0,0688	-0,1679	-0,1970	0,0167	ϕ
HWE	0,3787	0,6548	1,0000	0,4863	1,0000	0,4978	0,4863	0,2281	0,1164	0,8158	HWE
Locus	HLD93	HLD99	HLD88	HLD101	HLD67	HLD83	HLD114	HLD48	HLD124	HLD122	Locus
MAF	0,5563	0,5688	0,6063	0,5313	0,6188	0,5125	0,6188	0,6188	0,6375	0,5500	MAF
HET	0,5125	0,5375	0,4875	0,5875	0,4875	0,5250	0,4375	0,4875	0,4250	0,4750	HET
GD	0,4937	0,4905	0,4774	0,4980	0,4718	0,4997	0,4718	0,4718	0,4622	0,4950	GD
MP	0,3880	0,4050	0,3920	0,4320	0,3970	0,3890	0,3780	0,3970	0,3840	0,3680	MP
PD	0,3310	0,4870	0,4010	0,2190	0,2520	0,1240	0,2580	0,4640	0,3820	0,4610	PD
PE	0,4050	0,7180	0,2730	0,5000	0,2910	0,3530	0,2830	0,3950	0,5260	0,4160	PE
TPI	1,0300	1,0800	0,9800	1,2100	0,9800	1,0500	0,8900	0,9800	0,8700	0,9500	TPI
PIC	0,3718	0,3702	0,3635	0,3740	0,3605	0,3748	0,3605	0,3605	0,3554	0,3725	PIC
ϕ	-0,0319	-0,0895	-0,0148	-0,1735	-0,0270	-0,0444	0,0789	-0,0270	0,0867	0,0467	ϕ
HWE	0,8223	0,5001	1,0000	0,1203	0,8206	0,8175	0,3380	0,8199	0,4838	0,8222	HWE
Locus	HLD125	HLD64	HLD81	HLD136	HLD133	HLD97	HLD40	HLD128	HLD39	HLD84	Locus
MAF	0,5063	0,6188	0,6688	0,6063	0,6250	0,5750	0,5750	0,5188	0,6375	0,5375	MAF
HET	0,5875	0,5375	0,3625	0,4875	0,5250	0,4250	0,5500	0,5375	0,4500	0,5250	HET
GD	0,4999	0,4993	0,4430	0,4774	0,4688	0,4888	0,4888	0,4993	0,4622	0,4972	GD
MP	0,4300	0,3970	0,3920	0,3920	0,4200	0,3570	0,4150	0,3970	0,3920	0,3910	MP
PD	0,2610	0,5060	0,4160	0,4250	0,3310	0,4870	0,4010	0,2190	0,2520	0,1240	PD
PE	0,4500	0,4730	0,4980	0,2390	0,4270	0,4050	0,7180	0,2730	0,5000	0,2910	PE
TPI	1,2100	1,0800	0,7800	0,9800	1,0500	0,8700	1,1100	1,0800	0,9100	1,0500	TPI
PIC	0,3750	0,3746	0,3449	0,3635	0,3589	0,3693	0,3693	0,3746	0,3554	0,3736	PIC
ϕ	-0,1691	-0,0703	0,1879	-0,0148	-0,1138	0,1366	-0,1191	-0,0703	0,0327	-0,0497	ϕ
HWE	0,1775	0,649	0,1255	1,0000	0,2347	0,2573	0,3635	0,6616	0,8093	0,6556	HWE
MAF-major allele frequency, HET-observed heterozygosity, GD-gene diversity, MP-matching probability, PD-power of discrimination, PE-power of exclusion, TPI- typical paternity index, PIC-polymorphism information content, ϕ -coancestry coefficient, HWE-Hardy and Weinberg equilibrium - probability values of the exact test based on the 2300 shufflings.											
The combined values of the 30 loci: MP= $8,19 \times 10^{-12}$, PD= 0.99999999999918											
PE= 0.99846024255029. The average value of ϕ = -0,0304											
*Statistically not significant after Bonferroni's correction adjusted to multiple testing (0,05/30=0.0024 as an acceptable significance level)											

Tabela 3. Parametry biostatystyczne oraz analiza równowagi Hardy’ego i Weinberga dla 30 markerów InDel zestawu Investigator DIPplex ujawnione na podstawie analizy prób pochodzących od 80 niespokrewnionych osób z Polski Centralnej.

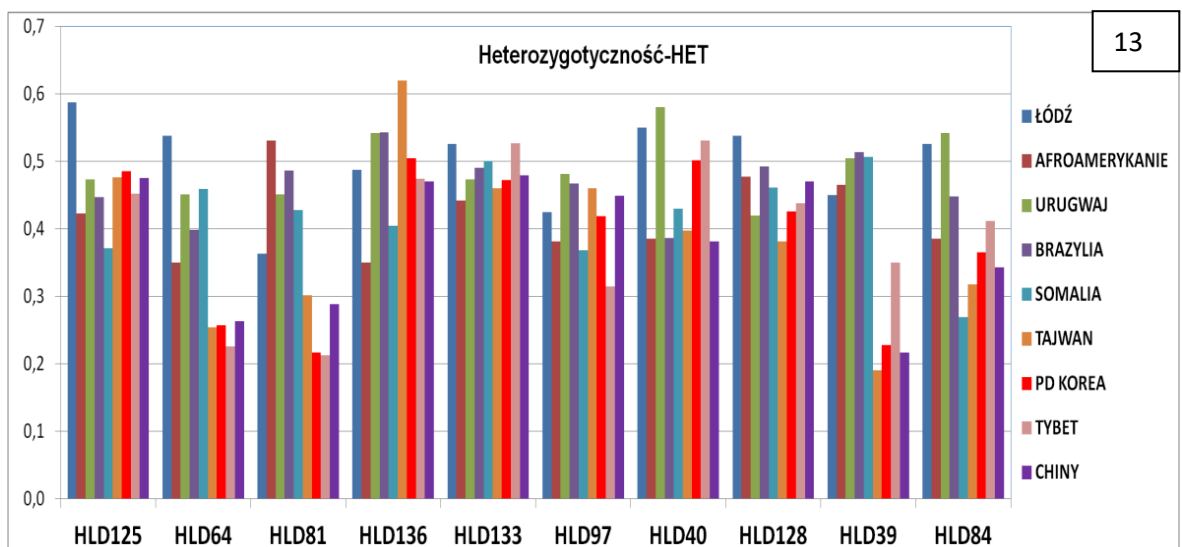
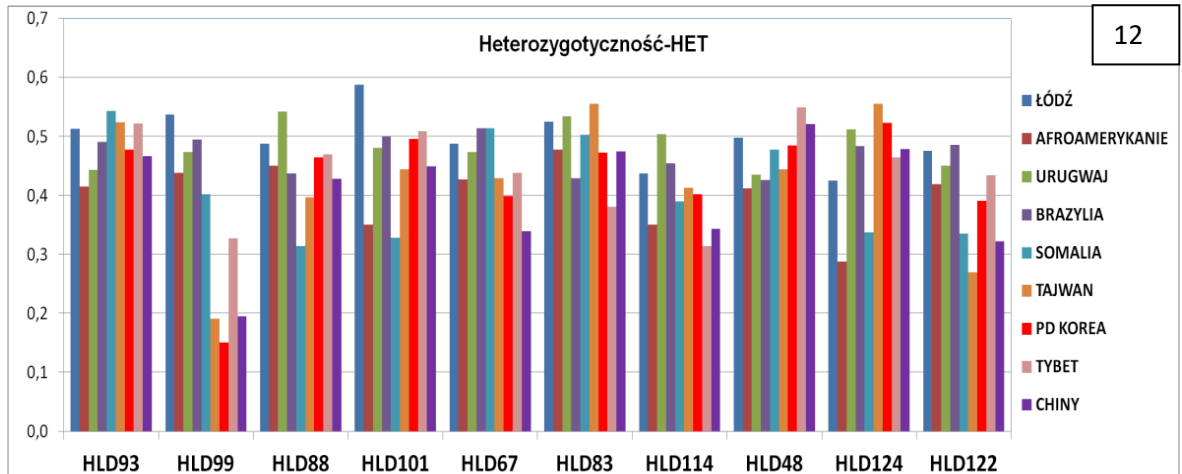
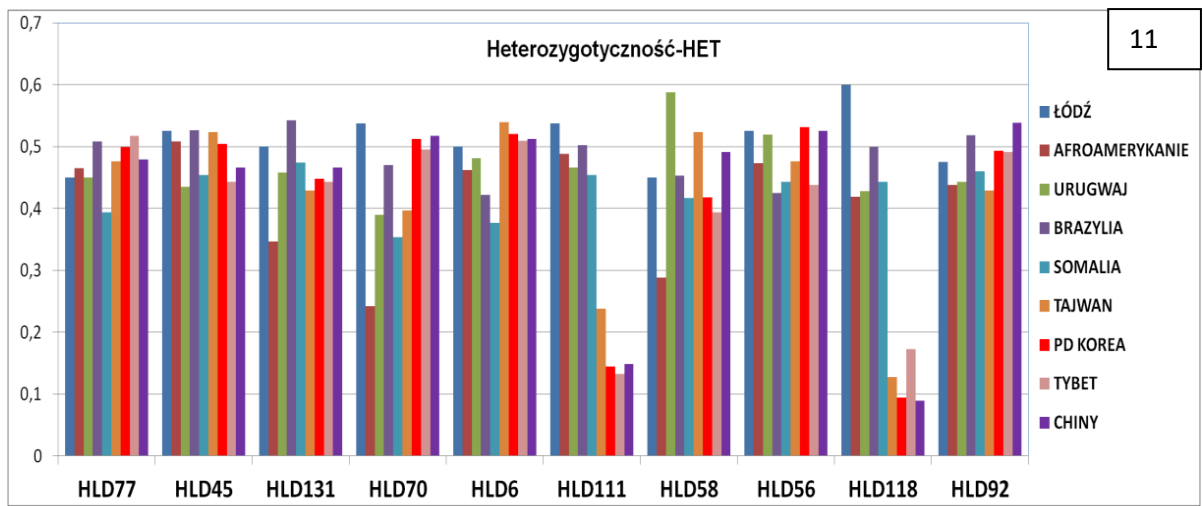
Wartości heterozygotyczności z populacji regionu łódzkiego porównano z wartościami heterozygotyczności obserwowanymi w innych populacjach: Polski [46], Danii [16], Niemiec [47], Litwy [48], Słowenii [48], Węgier [54], Czech [26], Portugalii [7], Włoch [49], Iraku [48], Turcji [48], Hiszpanii [25], Finlandii [55], Ameryki Północnej (populacja Afroamerykanów) [17], Urugwaju [50], Brazylii [51], Somalii [55], Tajwanu [46], Korei Południowej [52], Tybetu [27] oraz Chin [53]. Analizę porównawczą zestawiono na rycinach 5- 13.



Ryciny 5-7. Porównanie wartości heterozygotyczności uzyskanych dla markerów zestawu Investigator DIPplex w badanej populacji regionu łódzkiego z innymi populacjami Polski i świata

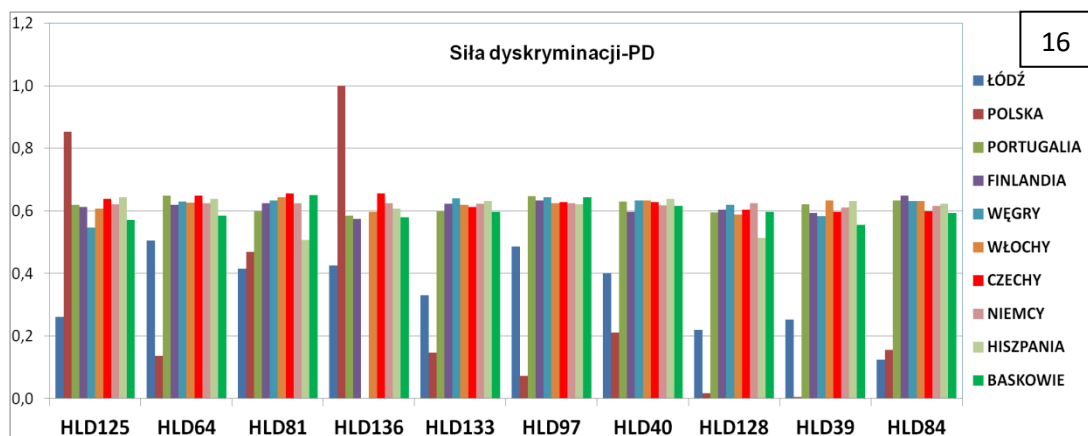
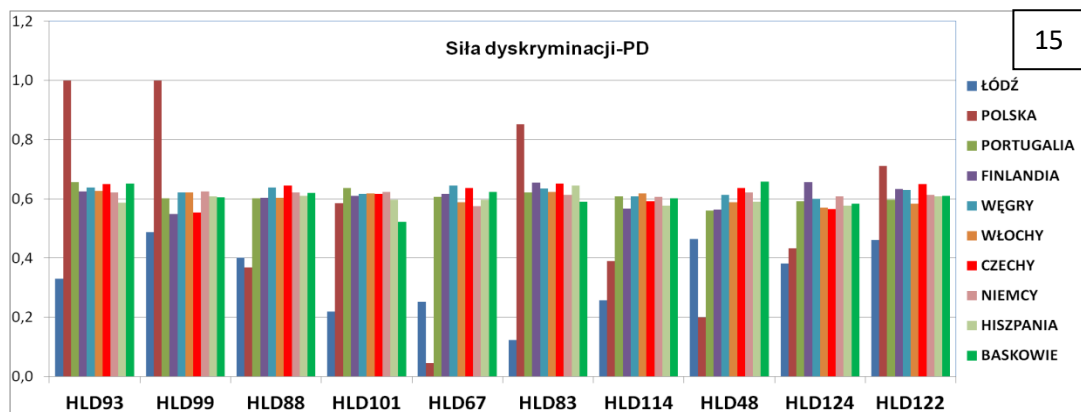
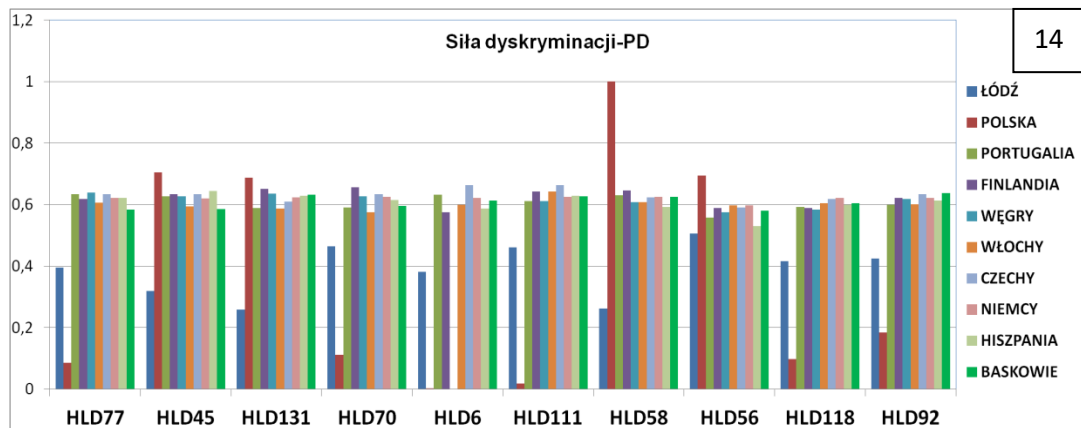


Ryciny 8-10. Porównanie wartości heterozygotyczności uzyskanych dla markerów zestawu Investigator DIPplex w badanej populacji regionu łódzkiego z innymi populacjami Polski i świata

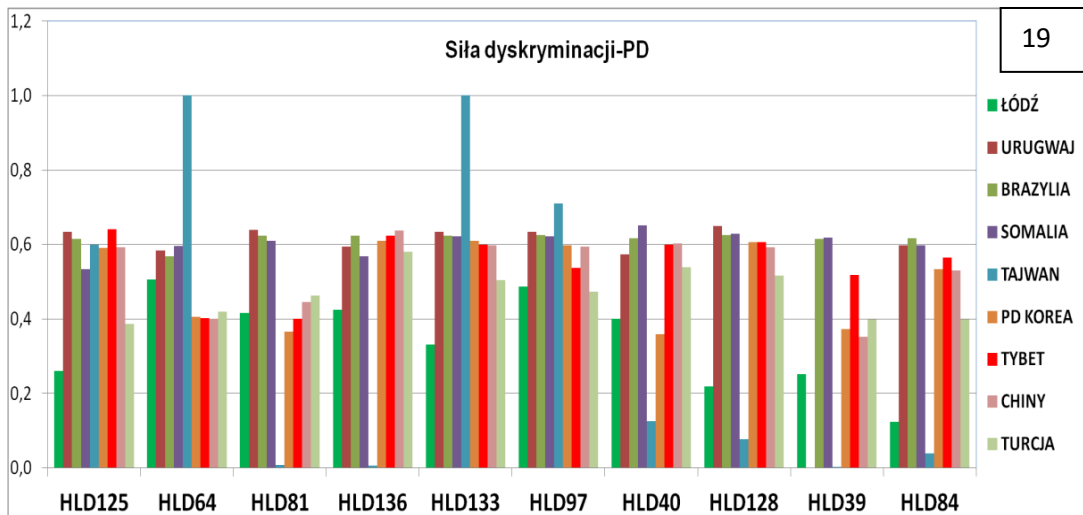
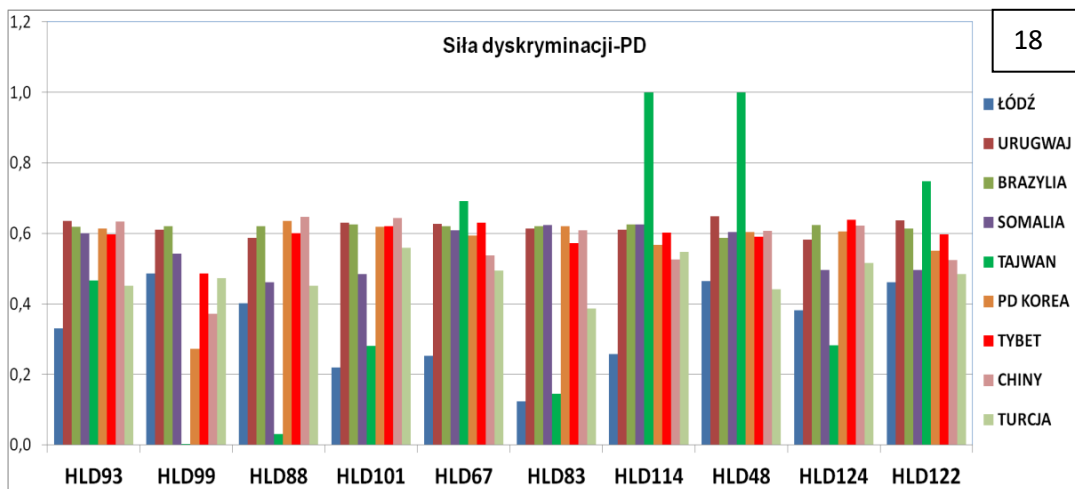
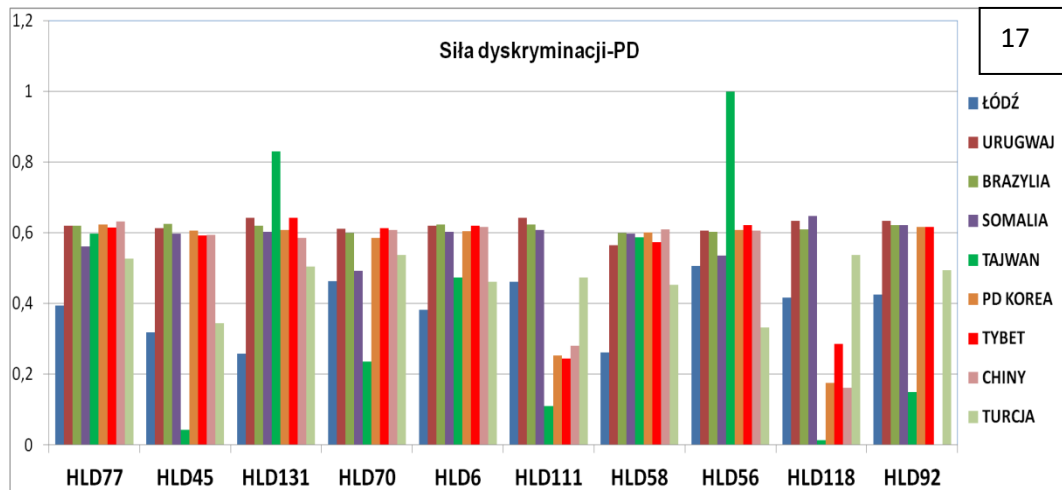


Ryciny 11-13. Porównanie wartości heterozygotyczności uzyskanych dla markerów zestawu Investigator DIPplex w badanej populacji regionu łódzkiego z innymi populacjami Polski i świata

Na kolejnych rycinach 14-21 zestawiono ze sobą uzyskane parametry oceniające siłę dyskryminacji (PD) w populacji regionu łódzkiego oraz: Polski [46], Portugalii [7], Finlandii [55], Węgier [54], Włoch [49], Czech [26], Niemiec [47], Hiszpanii [25], kraju Basków [25], Urugwaju [50], Brazylii [51], Somalii [55], Tajwanu [46], Korei Południowej [52], Tybetu [27], Chin [53] oraz Turcji [48].

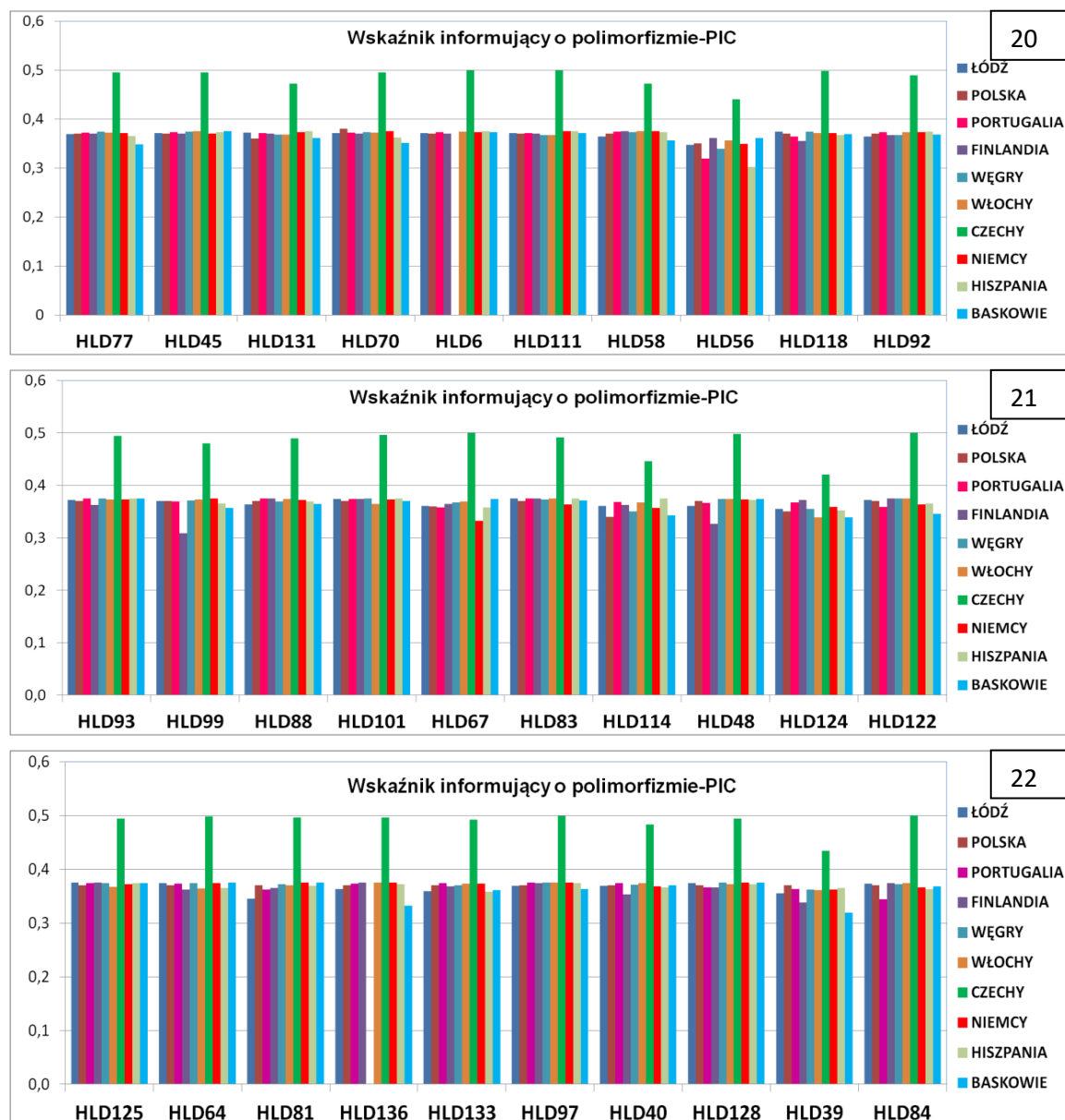


Rycina 14-16. Porównanie wartości siły dyskryminacji (PD) uzyskanych dla markerów zestawu Investigator DIPplex w populacji regionu łódzkiego z innymi populacjami

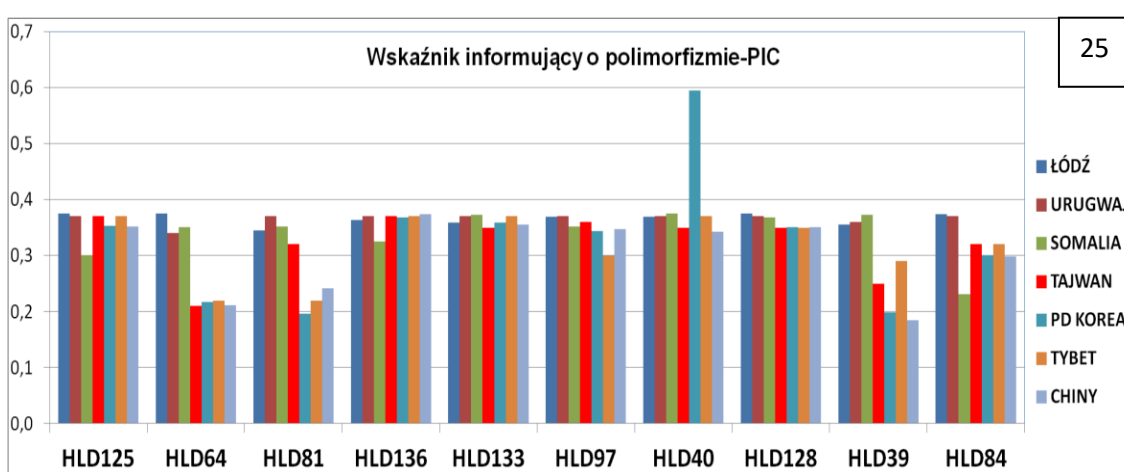
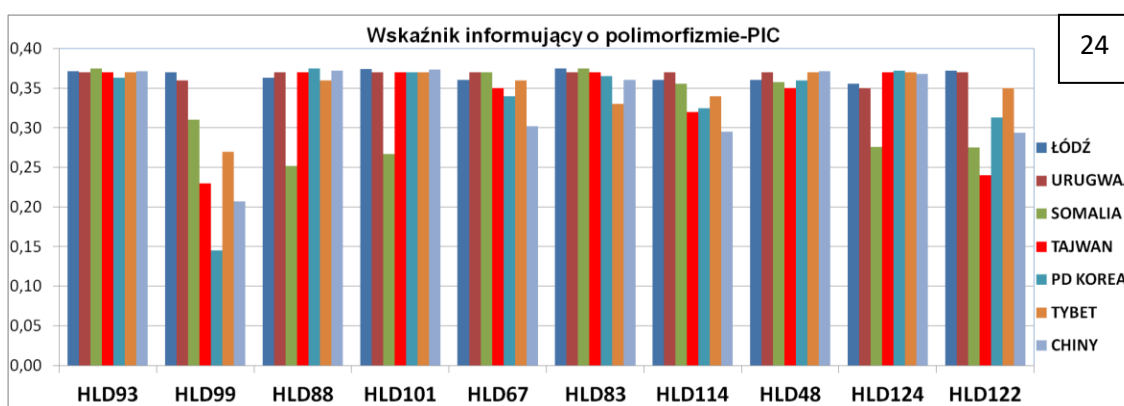
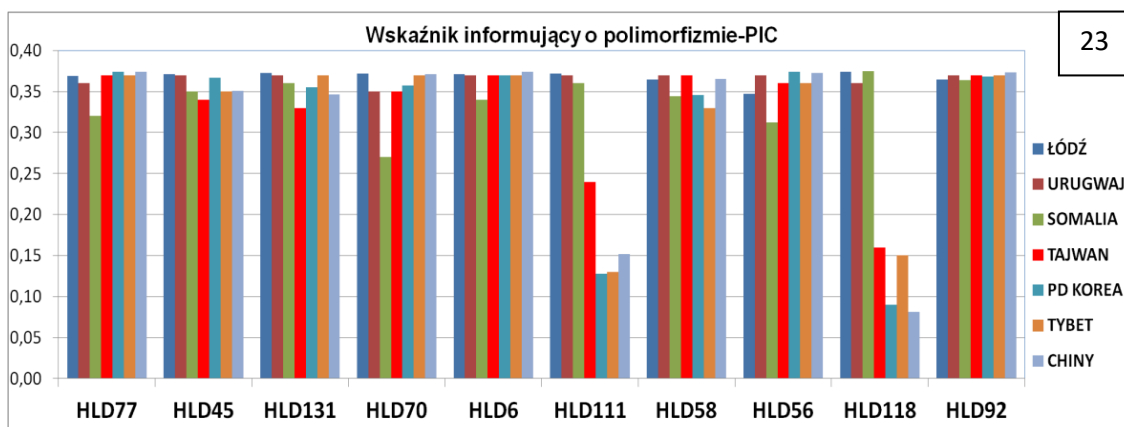


Rycina 17-19. Porównanie wartości siły dyskryminacji (PD) uzyskanych dla markerów zestawu Investigator DIPlex w populacji regionu łódzkiego z innymi populacjami

Na kolejnych rycinach 20-25 zestawiono ze sobą uzyskane wskaźnik informacji o polimorfizmie (PIC) w populacji regionu łódzkiego oraz: Polski [46], Portugalii [7], Finlandii [55], Węgier [54], Włoch [49], Czech [26], Niemiec [47], Hiszpanii [25], kraju Basków [25], Urugwaju [50], Somalii [55], Tajwanu [47], Korei Południowej [52], Tybetu [27], Chin [53].

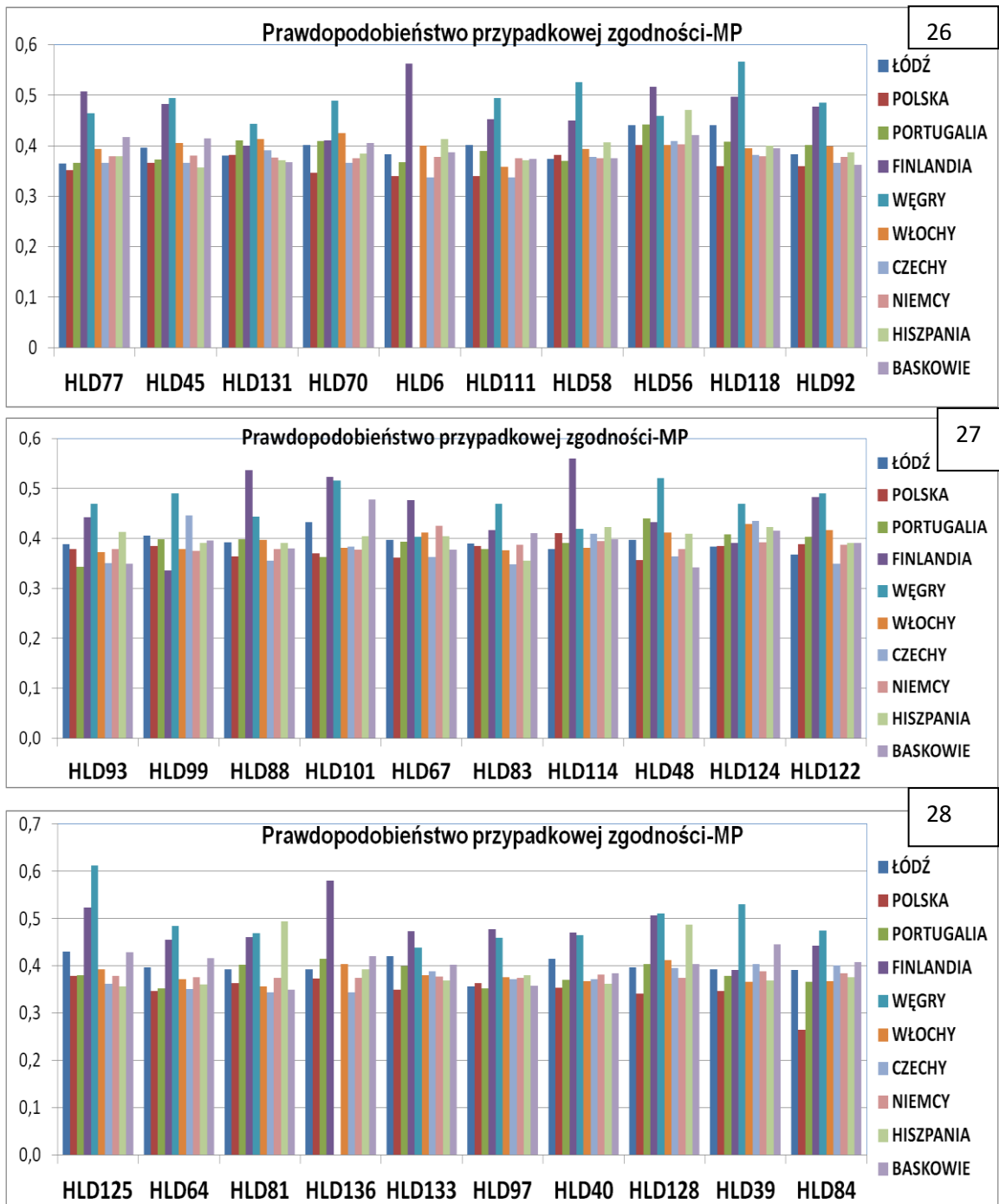


Rycina 20-22. Porównanie wartości wskaźnika informacji o polimorfizmie (PIC) uzyskanych dla markerów zestawu Investigator DIPplex w populacji Polski z innymi populacjami

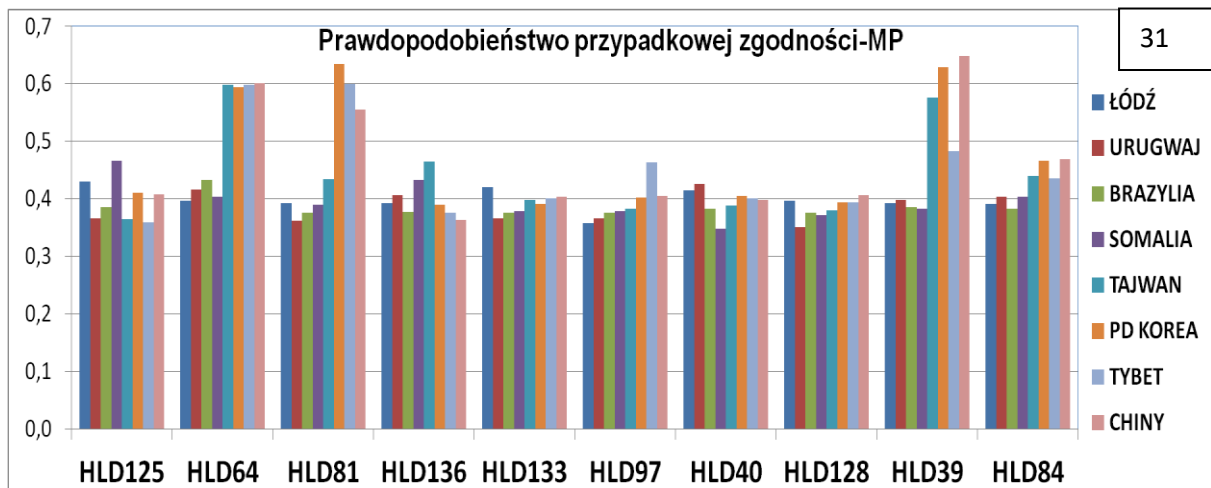
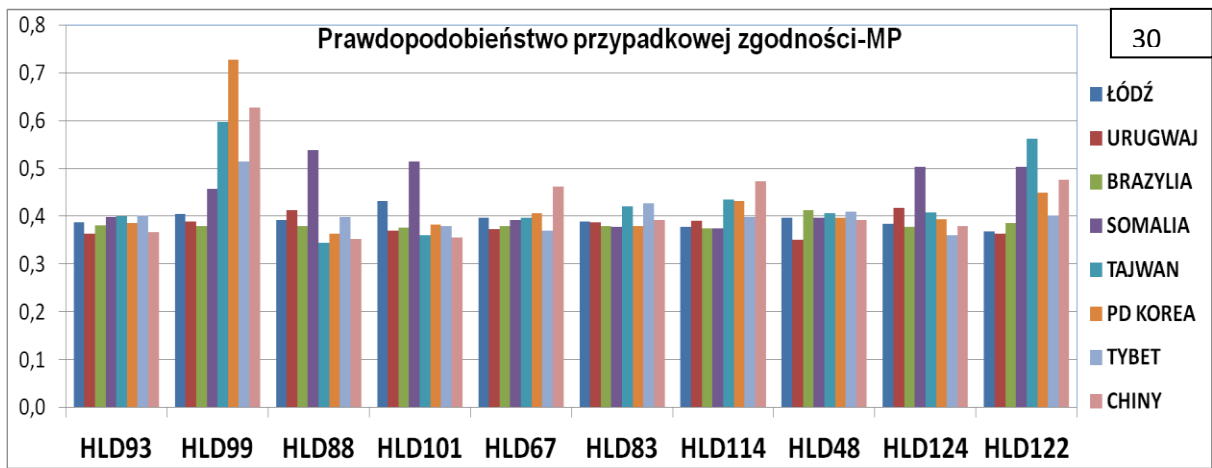
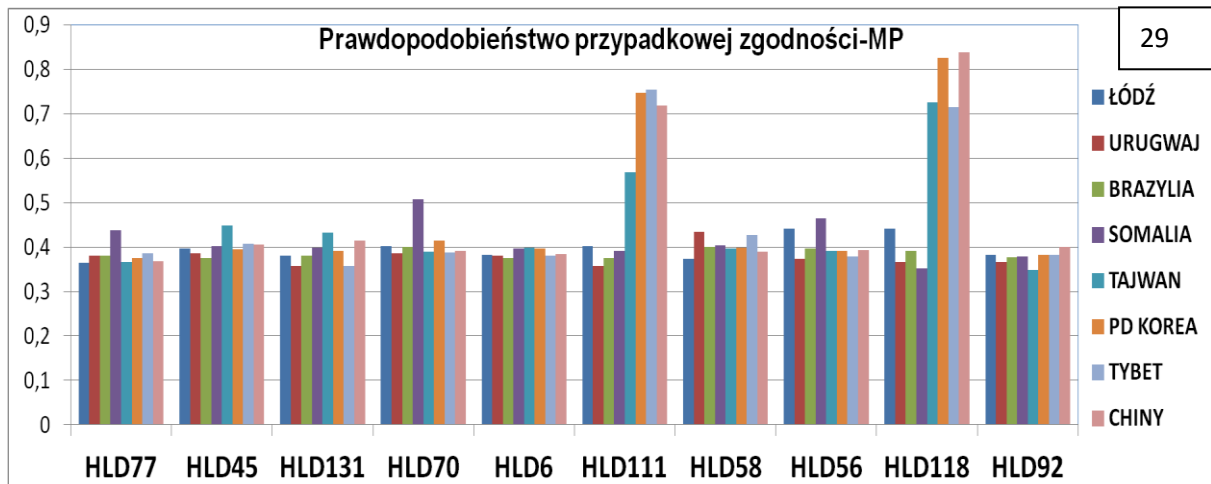


Rycina 23-25. Porównanie wartości wskaźnika informacji o polimorfizmie (PIC) uzyskanych dla markerów zestawu Investigator DIPplex w populacji Polski z innymi populacjami.

Na następnych rycinach 26-31 zestawiono ze sobą uzyskane wartości prawdopodobieństwa przypadkowej zgodności (MP) w populacji regionu łódzkiego oraz: Polski [46], Portugalii [7], Finlandii [55], Węgier [54], Włoch [49], Czech [26], Niemiec [47], Hiszpanii [25], kraju Basków [25], Urugwaju [50], Brazylii [51], Somalii [55], Tajwanu [46], Korei Południowej [52], Tybetu [27], Chin [53].



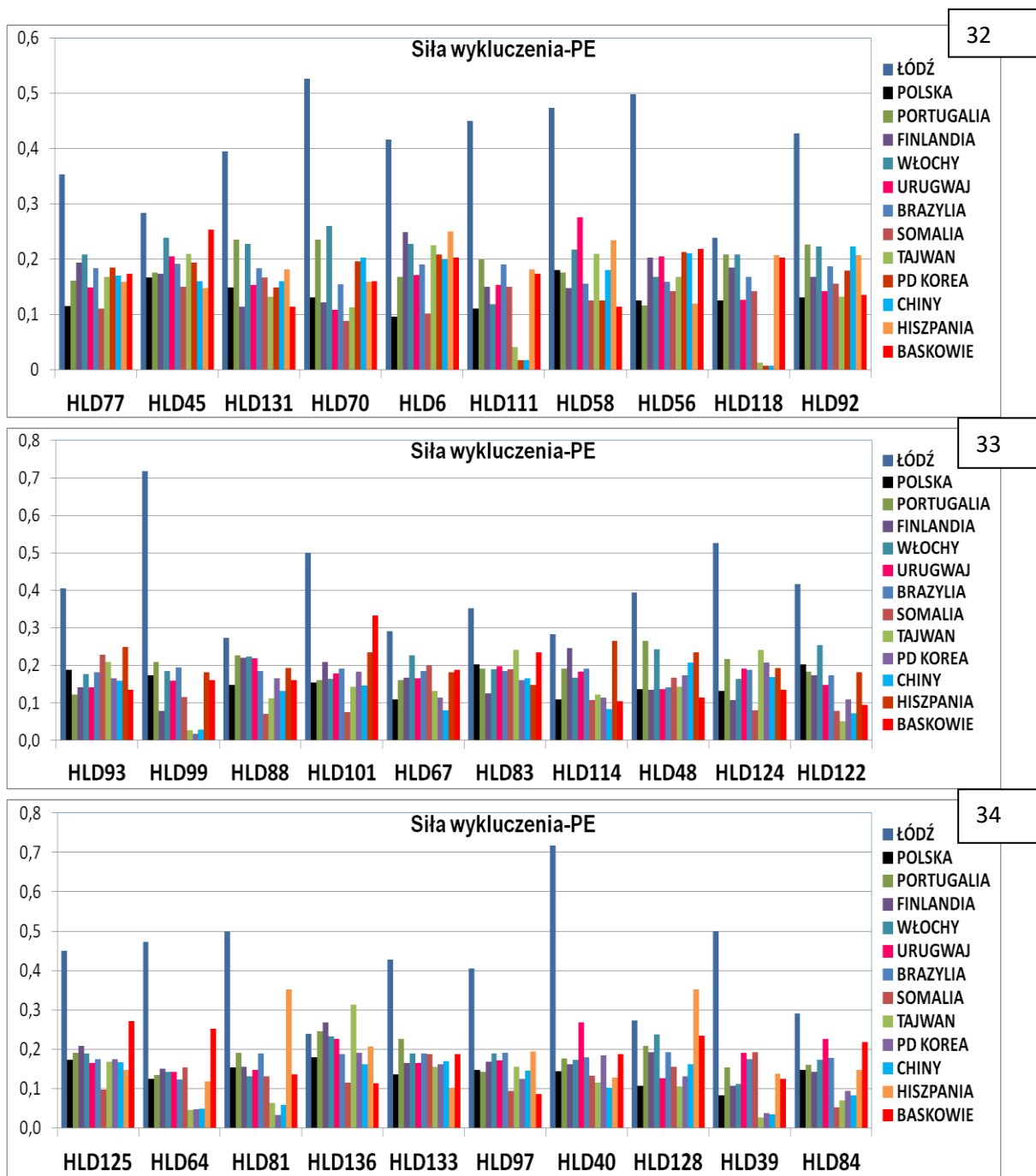
Rycina 26-28. Porównanie prawdopodobieństwa przypadkowej zgodności (MP) uzyskanych dla markerów zestawu Investigator DIPlex w populacji Polski z innymi populacjami



Rycina 29-31. Porównanie wartości prawdopodobieństwa przypadkowej zgodności (MP) uzyskanych dla markerów zestawu Investigator DIPlex w populacji Polski z innymi populacjami

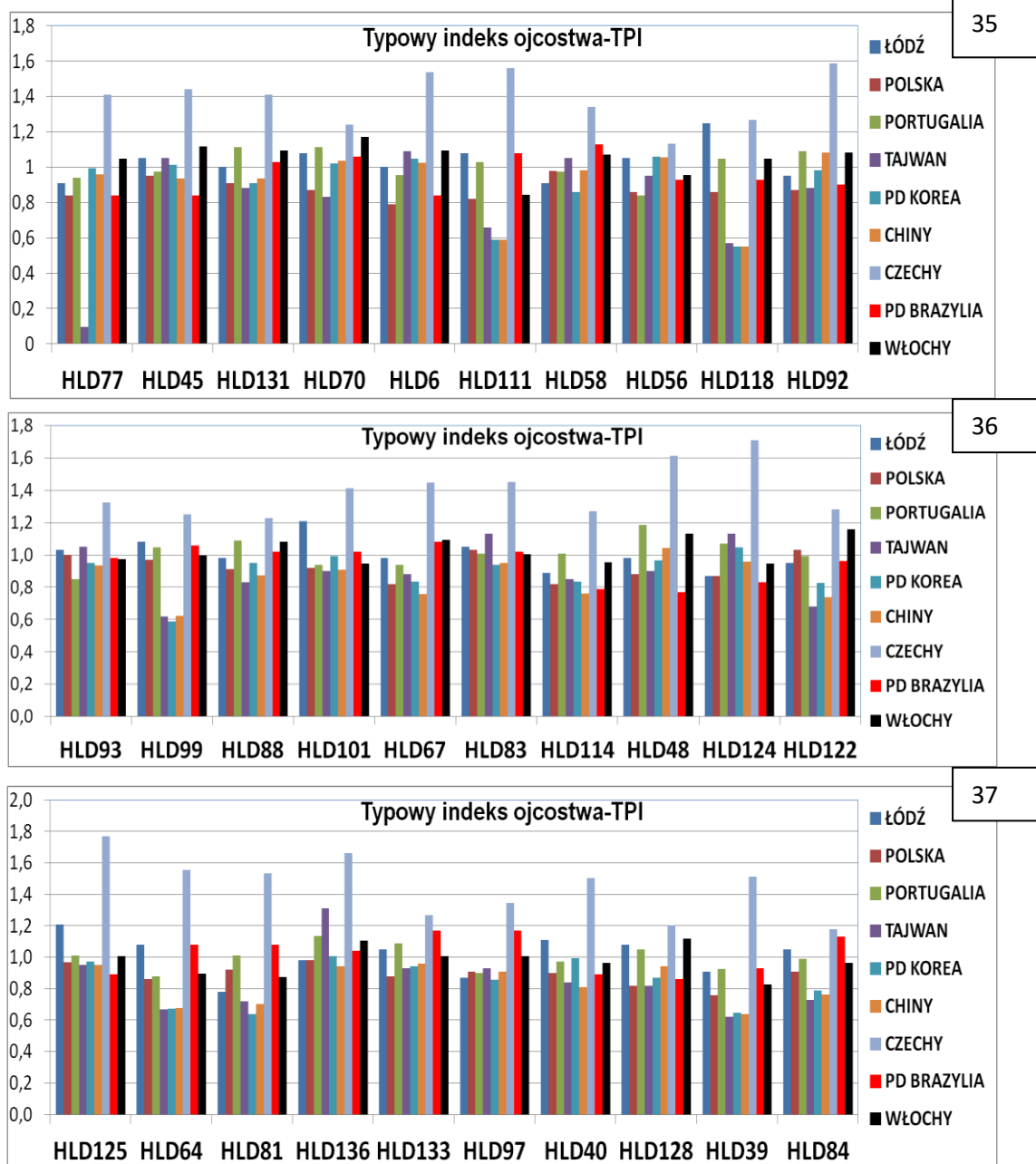
Na kolejnych rycinach 32-34 zestawiono ze sobą uzyskane wartości siły wykluczenia (PE) w populacji regionu łódzkiego oraz: Polski [46], Portugalii [7], Finlandii [55],

Włoch [49], Hiszpanii [25], kraju Basków [25], Urugwaju [50], Brazylii [51], Somalii [55], Tajwanu [46], Korei Południowej [52] oraz Chin [53].



Rycina 32-34. Zestawienie wartości siły wykluczenia (PE) oceniającej przydatność badanych markerów do badań ojcostwa w populacji Polski w zestawieniu z innymi populacjami Europy i świata

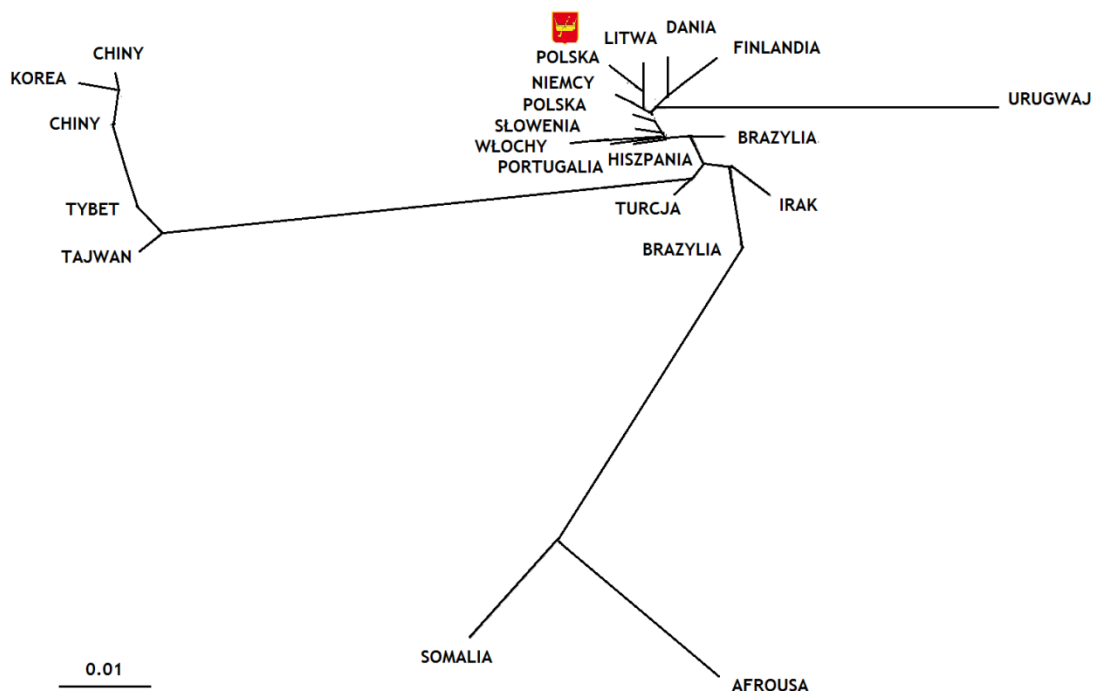
Na rycinach 35-37 porównano ze sobą uzyskane wartości typowego indeksu ojcostwa (TPI) w populacji regionu łódzkiego oraz: Polski [46], Portugalii [7], Włoch [49], Brazylii [23], Tajwanu [46], Korei Południowej [52], Czech [26], Włoch [49] oraz Chin [53].



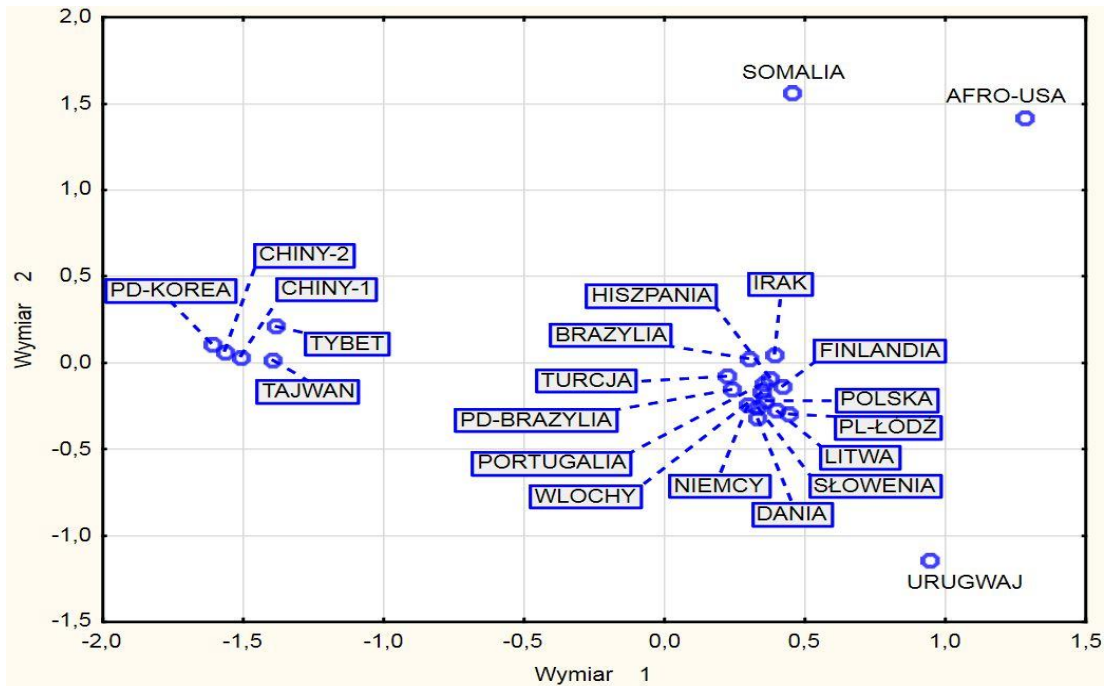
Rycina 35-37. Zestawienie wartości typowego indeksu ojcostwa (TPI) uzyskanych dla 30 markerów InDel zestawu Investigator Qiagen w populacji regionu łódzkiego z innymi populacjami Europy i świata

4.3 Analiza dystansów i filogenezy

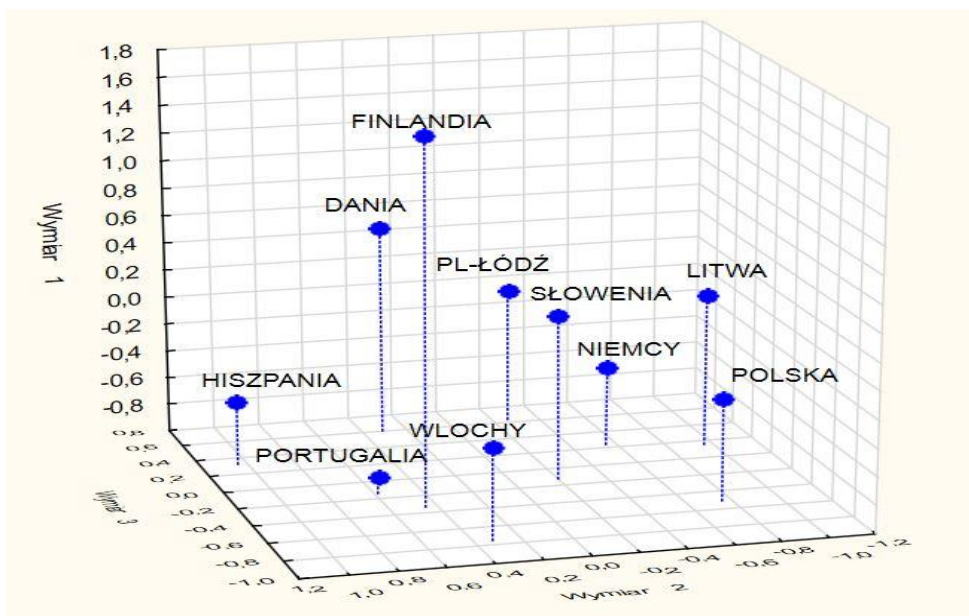
Z uzyskanych rozkładów częstości alleli w populacji Polski Centralnej regionu łódzkiego w zakresie 30 polimorfizmów insercyjno-delecyjnych zestawu Investigator DIPplex skonstruowano macierz, na podstawie, której wyznaczono drzewo radialne dystansów genetycznych z zastosowaniem metody przyłączania sąsiadów - NJ (ang. Neighbour-Joining). Skonstruowane drzewo radialne przedstawiono na rycinie 38. Państwa użyte do analizy porównawczej to: Polska, Dania, Czechy, Niemcy, Litwa, Finlandia, Słowenia, Czechy, Portugalia, północno-wschodniej części Włoch, Turcja, Hiszpania, Irak, Ameryka Północna (populacja Afroamerykanów), Urugwaj, Brazylia, Somalia, Tajwan, Południowa Korea, Tybet oraz Chiny [7, 16, 17, 23, 25, 26, 27, 43-55]. Dodatkowo dla lepszego zwizualizowania odległości pomiędzy poszczególnymi populacjami wykonano skalowanie wielowymiarowe w programie STATISTICA wersja v.12.5 [45].



Rycina 38. Radialne drzewo skonstruowane w oparciu o dystans genetyczny dzielący populację Polski od innych populacji świata z użyciem metody przyłączania sąsiada, skonstruowany w oparciu o rozkład 30 markerów InDel zestawu Investigator DIPplex



Rycina 39. Skalowanie wielowymiarowe obrazujące dystans genetyczny pomiędzy badaną populacją Polski Centralnej a innymi populacjami Europy i świata na wykresie dwuwymiarowym, uzyskanym w oparciu o rozkład 30 markerów zestawu Investigator DIPplex w programie STATISTICA v.12.5



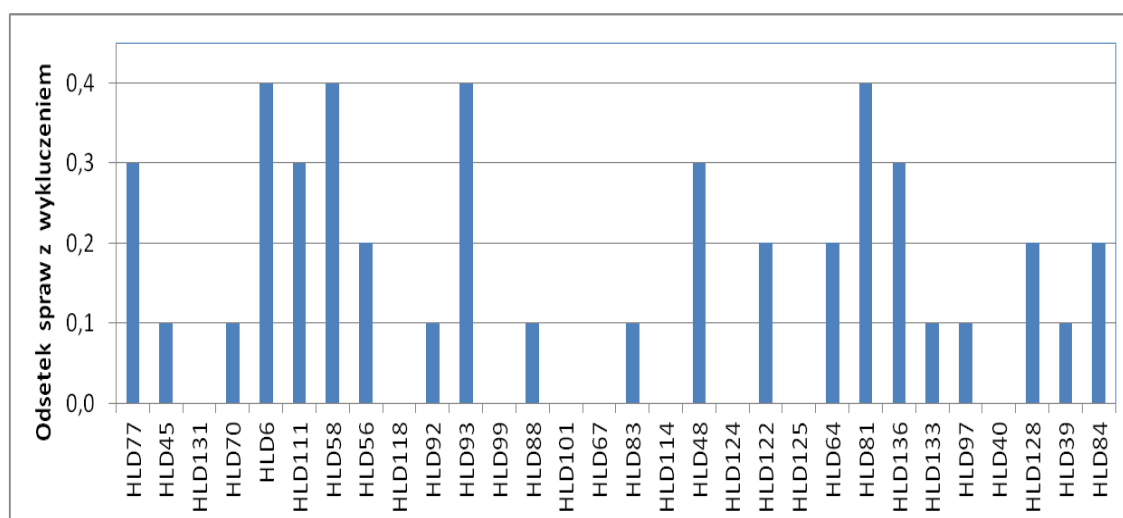
Rycina 40. Skalowanie wielowymiarowe obrazujące dystans genetyczny pomiędzy badaną populacją Polski a innymi populacjami Europy na wykresie trójwymiarowym uzyskane w oparciu o rozkład 30 markerów insercyjno-delecyjnych

4.4 Analiza spraw ojcostwa

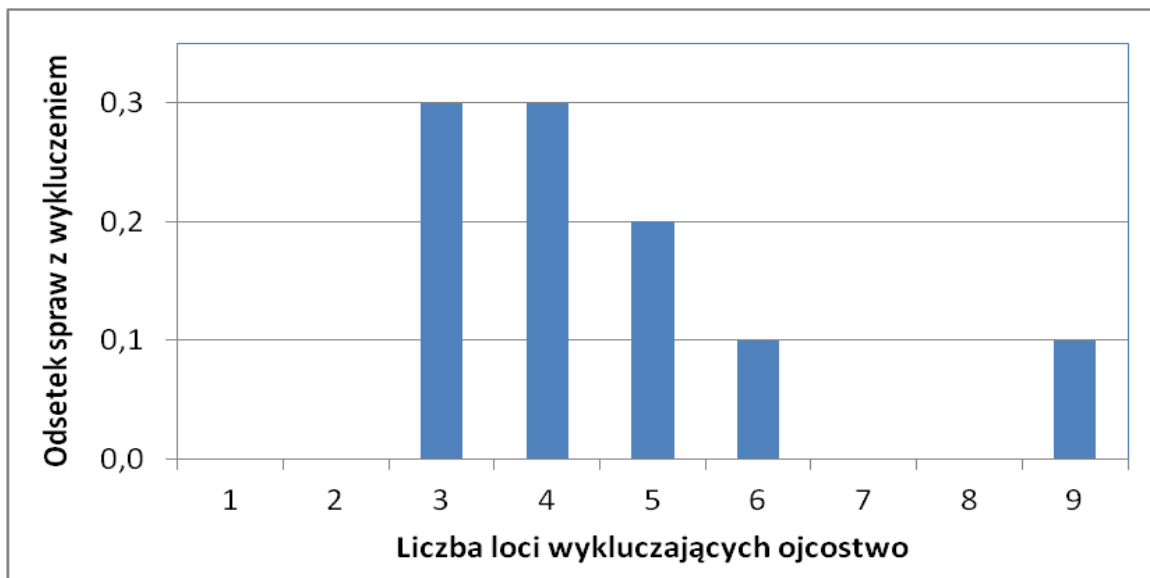
Analizie poddano łącznie 40 spraw spornego ojcostwa w zakresie 30 markerów InDel zestawu Investigator DIPplex, z czego 10 spraw z wykluczeniem ojcostwa, które uzyskano w oparciu, o co najmniej 3 wykluczające markery oraz 30 spraw z potwierdzeniem ojcostwa. Sprawy wcześniej badano w zakresie w zakresie 15-23 układów STR, i zakończyły się one wydaniem opinii wykluczającej ojcostwo względem badanego dziecka w co najmniej 4 układach, bądź potwierdzającej ojcostwo z prawdopodobieństwem graniczącym z pewnością, tj. minimum 99,9999% zgodnie z wytycznymi Komisji Genetyki Sądowej PTMSiK [33]. Przydatność układu do badań ojcostwa zestawiono z wybranymi parametrami przydatności obliczonymi na podstawie uzyskanego rozkładu cech obserwowanego w badanej populacji.

Na rycinie 41 pokazany został wykres przedstawiający skuteczność wykluczania ojcostwa w zakresie 30 badanych markerów insercyjno-delecyjnych, oszacowaną na podstawie analizy 10 spraw z wyłączeniem ojcostwa.

Na rycinie 42 zobrazowany został wykres przedstawiający skuteczność oraz liczbę odnotowanych niezgodności pomiędzy domniemanym ojcem a dzieckiem po badaniu systemem 30 loci zestawu Investigator DIPplex w sprawach, w których ojcostwo zostało wyłączone.



Rycina 41. Porównanie skuteczności wykluczania ojcostwa uzyskanych dla poszczególnych markerów InDel zestawu Investigator DIPplex w oparciu o analizę 10 spraw z wykluczeniem ojcostwa.



Rycina 42. Odsetek spraw z wykluczeniem ojcostwa uzyskanych w zakresie od 3 do 9 loci insercyjno-delecyjnych po badaniu zestawem Investigator DIPplex w populacji Polski centralnej.

5 Omówienie wyników i dyskusja

5.1 Analiza populacyjna i porównawcza

Analizie poddano łącznie 160 alleli oznaczone u 80 niespokrewnionych osób urodzonych w regionie łódzkim używając zestawu Investigator DIPplex. Pomimo, że polimorfizmy insercyjno-delecyjne nie są używane w rutynowej pracy, doskonale spisują się one przy identyfikacji próbek zdegradowanych oraz stanowią uzupełnienie w sprawach spornych podnosząc wartość dowodową badania [15,21].

Biorąc pod uwagę częstość występowania insercji/delecji z ryciny 4, można zauważyć, iż markery: HLD77, HLD45, HLD131, HLD70, HLD6, HLD111, HLD118, HLD93, HLD99, HLD101, HLD83, HLD122, HLD125, HLD64, HLD97, HLD40, HLD128 oraz HLD84, charakteryzują się podobnym procentem delecji i insercji. Natomiast markery HLD58, HLD56, HLD67, HLD48, HLD124, HLD133 w populacji łódzkiej charakteryzują się przewagą insercji. Pozostałe markery tj. HLD92, HLD88, HLD114, HLD81, HLD136 i HLD39 wykazują przewagę delecji.

Do analizy porównawczej wykorzystano uzyskane rozkłady cech dla 80 niespokrewnionych osób z regionu łódzkiego Polski Centralnej oraz dane dostępne dla Europy i świata uzyskane po badaniu zestawem Investigator DIPplex. Polacy należą do populacji Słowian tak samo jak Czesi, Ukraińcy Słowacy czy też Rosjanie. Populacja Polski uważana jest za jedną z najbardziej homogennych populacji środkowo-wschodniej części Europy. Badania mitochondrialnego DNA oraz chromosomu Y nie wykazały znacznych różnic pomiędzy Słowianami. Populacje z różnych części Europy są genetycznie bardziej zbliżone do siebie niż populacje pochodzące z różnych kontynentów [56, 57]. W tabeli 2 zaprezentowano zestawienie częstości występowania insercji dla 30 markerów InDel multipleksu Investigator DIPplex w 22 populacjach w zestawieniu z badaną populacją z regionu łódzkiego Polski Centralnej. W tej tabeli można zaobserwować, że populacje azjatyckie charakteryzują się zbliżonymi wartościami obecności insercji w badanych 30 markerach zestawu Investigator DIPplex, podobnie populacje europejskie wykazują w tym zakresie pewne podobieństwo [7, 16, 25-27, 46-49, 52-55]

5.2 Analiza parametrów i przydatności

W oparciu o uzyskany rozkład 160 alleli pochodzący od 80 niespokrewnionych osób urodzonych w regionie łódzkim Polski Centralnej obliczono zestaw parametrów, które składają się na charakterystykę genetyczną populacji oraz określają przydatność multipleksu Investigator DIPplex w badaniach z zakresu genetyki sądowej. Parametry te znajdują się w tabeli 3. Uzyskany rozkład genotypów w zakresie każdego z badanych 30 markerów zestawu Investigator DIPplex wskazuje na stan równowagi Hardy'ego-Weinberga (HWE) w badanej populacji. Wartości wskaźników inbredu pokazane w tabeli 2 znajdują się w przedziale -0,197 do 0,188. Średnią wartością dla badanej populacji jest -0,025. Jest to wynik znacznie niższy od 0,01, jaki rekomenduje FBI jako graniczną wartość tego współczynnika. Świadczy to o braku wsobności w obrębie populacji centralnej Polski, podobnie jak w innych dużych populacjach europejskich [58].

Z obliczeń zebranych w tabeli 3 wynika, że najwyższe wskaźniki zmienności w zakresie heterozygotyczności, zmienności genowej, siły dyskryminacji, siły wyłączenia, indeksu ojcostwa, wskaźnika polimorfizmu oraz najniższe wartości prawdopodobieństwa przypadkowej zgodności zanotowano w populacji Polski centralnej dla markerów: HLD118, HLD101, HLD125, HLD40, HLD70, HLD111,

HLD99, HLD64, HLD128, HLD45, HLD56, HLD83, HLD133, HLD84, HLD92, HLD122, HLD97, HLD39, HLD124. Dzięki wartościom, jakie wymazują te parametry można je uznać za najbardziej przydatne w kontekście genetyki sądowej. Markerami, które dają najmniejszą wartość dowodową są natomiast: HLD77, HLD88, HLD67, HLD114, HLD48, HLD136. Markerem, który najslabiej wypada wśród porównywanych 30 markerów zestawu Investigator DIPplex jest marker HLD81.

Z przeprowadzonej analizy wynika, że z wyjątkiem układów HLD56, HLD92, HLD124, HLD64, HLD133 najwyższe wartości parametrów przydatności korelują z najbardziej zrównoważonym rozkładem dwóch alleli, tj. częstością alleli jak najbardziej zbliżoną do wartości 0,5 (MAF).

Wartości przydatności parametrów, jakie uzyskano dla 30 markerów InDel badanej populacji Polski Centralnej zestawiono z dostępnymi danymi dla populacji Europy i świata, tj. innej populacji Polski [46], Danii [16], Niemiec [47], Litwy [48], Słowenii [48], Węgier [54], Czech [26], Portugalii [7], Włoch [49], Iraku [48], Turcji [48], Hiszpanii [25], Finlandii [55], Ameryki Północnej (populacja Afroamerykanów) [17], Urugwaju [50], Brazylii [51], Somalii [55], Tajwanu [46], Korei Południowej [52], Tybetu [27] oraz Chin [53]. Na rycinach 5-13 pokazano zestawienie parametru przydatności, jaką jest heterozygotyczność. Populacja europejska, na którą składają się populacje Polski [46], Danii [16], Niemiec [47], Litwy [48], Słowenii [48], Węgier (tutaj brak danych dla HLD6 i HLD136) [54], Czech [26], Portugalii [7], Włoch [49], Turcji [48], Hiszpanii [25] oraz Finlandii [55] została przedstawiona na wykresach znajdujących się na rycinach 5-10. Niższą heterozygotycznością w porównaniu do pozostałych populacji charakteryzuje się populacja Litwy i Niemiec pod względem markera HLD131, populacja Polski i Czech względem markerów HLD6, HLD111 i HLD39, populacja Turcji względem markerów HLD45, HLD56 i HLD125, populacja Finlandii pod względem markera HLD99, populacja Iraku pod względem HLD136 i HLD133. Wyższą heterozygotyczność na tle analizowanych populacji wykazała się Dania pod względem markera HLD124 oraz populacja Hiszpanii pod względem markerów HLD81 oraz HLD128. Znaczne rozbieżności występują na wykresach, gdzie uwidoczniła się heterozygotyczność dla populacji świata w tym Urugwaju, Brazylii, Somalii, Ameryki Północnej, Tajwanu, Korei Południowej, Tybetu oraz Chin. Znacznie niższą heterozygotyczność, zwykle nieprzekraczającą 30% wykazują populacje azjatyckie pod względem markerów: HLD111, HLD118, HLD99, HLD64, HLD81 oraz HLD39. Populacje wywodzące się z Afryki charakteryzują się niższą heterozygotycznością pod względem HLD70, HLD58, HLD101, HLD124 oraz

HLD136. Populacje Ameryki Południowej są stosunkowo podobne pod względem heterozygotyczności do badanej populacji Polski.

Kolejnym ocenianym parametrem jest siła dyskryminacji (PD), która określa prawdopodobieństwo, że dwie losowo wybrane osoby z populacji nie będą miały takiego samego profilu DNA. Na rycinach 14-16 pokazane jest porównanie tego parametru wśród populacji europejskich w tym: Polski [46], Portugalii [7], Finlandii [55], Węgier [54], Włoch [49], Czech [26], Niemiec [47], Hiszpanii [25], kraju Basków [25]. Badana populacja pochodząca z regionu łódzkiego charakteryzuje się stosunkowo niską siłą dyskryminacji w zakresie wszystkich badanych markerów. Taki wynik może być spowodowany małą liczną populacją badaną (80 osób). Inna populacja Polski [46] w większości markerów również wykazuje niższą wartość siły dyskryminacji, a w zakresie markerów HLD58, HLD93, HLD99, HLD83, HLD125 ORAZ HLD136 wykazuje znacznie wyższą siłę dyskryminacji w porównaniu do pozostałych populacji Europy. Na rycinach 17-19 zestawiono populacje świata. Wyraźnie można zaobserwować tutaj wyższą siłę dyskryminacji w populacji Tajwanu [46], szczególnie dla markerów HLD56, HLD114, HLD48, HLD64 oraz HLD133, ale też znacznie niższą wartość w tej samej populacji dla markerów HLD111, HLD92, HLD99, HLD83, HLD81, HLD136, HLD40, HLD128 oraz HLD84. Kraje Azji również wykazują niską siłę dyskryminacji markera HLD111 i HLD39.

Kolejnym porównywanym markerem był wskaźnik informujący o polimorfizmie (PIC) pokazany na rycinach 20-25. Na pierwszych trzech rycinach znalazły się populacje europejskie: Polski [46], Portugalii [7], Finlandii [55], Węgier [54], Włoch [49], Czech [26], Niemiec [47], Hiszpanii [25], kraju Basków [25]. Pod względem tego parametru wszystkie populacje z wyjątkiem populacji Czech charakteryzują się podobieństwem. Natomiast, jeżeli przeanalizuje się pozostałe ryciny 23-25 z populacjami z całego świata, można na nich zaobserwować niższe wartości dla populacji azjatyckich pod względem markerów HLD111, HLD118, HLD99, HLD64, HLD81 oraz HLD39.

Prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności (MP) pokazane na rycinach 26-31 w populacji europejskiej również wykazuje podobieństwo, jedynie populacje Finlandii [55] i Węgier [54] wykazują wyższe wartości tego parametru. Z kolei populacje z azjatyckich krajów w tym: Tajwanu [46], Korei Południowej [52], Tybetu [27] oraz Chin [53] charakteryzują się znacznie wyższymi parametrem dla markerów HLD111, HLD118, HLD99, HLD64 oraz HLD39.

Na rycinach 32-34 zaprezentowano parametr siłę wykluczenia (PE). Badana populacja z regionu łódzkiego charakteryzuje się znacznie większą siłą wykluczenia w porównaniu do wszystkich porównywanych populacji. Kraje azjatyckie charakteryzują się znacznie niższą siłą wykluczenia markerów HLD111, HLD118, HLD99, HLD114, HLD122, HLD64, HLD81, HLD39 oraz HLD84, podobnie jak populacja Somalii [55].

Pod względem typowego indeksu ojcostwa (TPI) zawartego na wykresach 35-37 populacje europejskie [7, 46, 49] wykazują podobieństwo do populacji badanej z regionu łódzkiego. Wyższy indeks wykazuje populacja czeska [26] pod względem każdego markera. Populacje azjatyckie wykazują znacznie niższy typowy indeks ojcostwa dla markerów HLD111, HLD118, HLD99, HLD64, HLD81 oraz HLD39.

Łączna wartość siły dyskryminacji (PD) dla badanego zestawu loci wyniosła 0.99999999999918, a skumulowane prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności (MP) $8,19 \times 10^{-12}$. Dany profil DNA pojawi się w badanej populacji średnio w jednym przypadku na $1,2 \times 10^{11}$ osób. Niskie wartości MP uzyskano w badaniach dla populacji Polski [46] czy też Danii [16], odpowiednio $7,98 \times 10^{-14}$ oraz $3,3 \times 10^{-13}$. Shen i wsp. [53] obliczyli łączną wartość dla 30 badanych polimorfizmów insercyjno-delecyjnych oraz 21 polimorfizmów STR, co dało łączną wartość prawdopodobieństwa przodkowej zgodności jest na poziomie $2,652 \times 10^{-30}$. Skumulowane parametry statystyczne świadczą o przydatności badanego zestawu Investigator DIPplex w analizach z zakresu genetyki sądowej.

5.3 Analiza dystansów i filogenezy

Uzyskane rozkłady cech uzyskane dla badanej populacji Polski w zestawieniu z rozkładami cech uzyskanymi w populacjach: Litwy, Dani, Finlandii, Urugwaju, Niemiec, Słowenii, Włoch, Portugalii, Hiszpanii, Brazylii, Turcji, Iraku, Tajwanu, Tybetu, Chin, Korei Południowej, Somalii oraz Ameryki Północnej (populacja Afroamerykanów) [7, 16, 17, 23, 25, 26, 27, 46-55] posłużyły do skonstruowania macierzy odległości genetycznych pomiędzy populacjami. Na jej podstawie wykreślono radialne drzewo skonstruowane w oparciu o dystans genetyczny dzielący badaną populację Polski od innych populacji świata z użyciem metody przyłączania sąsiada. Gałęzie drzewa radialnego umieszczone na rycinie 38 łączące badane populacje pokazują, iż najdłuższe dystanse genetyczne dzielą badaną populację Polski od populacji Afryki, Afroamerykanów oraz Azji [17, 27, 46, 52, 53, 55]. Kolejnymi odległymi populacjami są: Urugwaj [50], Brazylia [23, 51], Irak [48] oraz Turcja [48]. Najkrótszy dystans genetyczny dzieli badaną populację Polski od kolejno: Litwy [48],

Niemiec [47], Polski [46], Danii [16], Finlandii [55] oraz Słowenii [48].

Trójwymiarowy wykres dla populacji Europy odzwierciedla w przybliżeniu dystans geograficzny dzielący te populacje. Wykresy na płaszczyźnie dwu i trójwymiarowej potwierdzają tezę, że populacje Europy są znacznie bardziej zbliżone do siebie genetycznie w porównaniu do porównywanych populacji z innych kontynentów.

5.4 Analiza spraw ojcostwa

Oceniono przydatność zestawu Investigator DIPplex do analiz ojcostwa na podstawie ekspertyz o ustalenie spornego ojcostwa wykonanych w Pracowni Genetyki Medycznej i Sądowej ZMS UM w Łodzi.

Na rycinie 43 zaprezentowano wykres przedstawiający skuteczność wykluczenia ojcostwa w zakresie 30 badanych markerów InDel. Jak wynika z tego wykresu markerami, które dały największą liczbę wykluczeń, tj. w 4 sprawach spośród 10 analizowanych spraw z wykluczeniem ojcostwa są: HLD6, HLD58, LD93 oraz HLD81. Najniższą skutecznością wyłączenia okazały się natomiast loci HLD131, HLD118, HLD99, LD101, HLD67, HLD114, HLD124, HLD125, HLD40, w których nie odnotowano podstawy do wykluczenia ojcostwa z żadnej z 10 spraw, gdzie badano mężczyznę, który nie był ojcem dziecka. Z uwagi jednak na stosunkowo małą ilość analizowanych spraw uzyskane wyniki wymagają potwierdzenia w oparciu o szerszy zakres analiz ojcostwa.

Z kolei na rycinie 41 zaprezentowano uzyskaną liczbę wykluczeń w zakresie badanego multipleksu Investigator DIPplex. Analiza tego wykresu wykazuje na to, że w największym odsetku spraw z wykluczeniem, wynoszącym po 30% odnotowano wykluczenie w zakresie 3 bądź wykluczenie w 4 badanych loci InDel. Odnotowano również sprawy z wykluczeniem w 5, 6, a nawet 9 badanych loci InDel. Biorąc pod uwagę wszystkie 10 analizowanych spraw z wykluczeniem ojcostwa należy przyjąć, że średnio po badaniu zestawem 30 markerów insercyjno-delecyjnych uzyskamy wykluczenie w zakresie 4 lub 5 markerów.

W 30 sprawach potwierdzających ojcostwo nie ujawniono mutacji w regionach DIP.

W związku z małą liczbą spraw badanego ojcostwa (40 spraw), w zarówno, jeśli idzie o sprawy wykluczające ojcostwo (10 spraw), jak i potwierdzające ojcostwo 30 spraw analiza oceniająca przydatność zestawu Investigator DIPplex powinna zostać w przyszłości poszerzona o znacznie większą liczbę analiz ojcostwa.

6 Wnioski

Analiza rozkładu 160 alleli pochodzących od 80 niespokrewnionych osób obu płci pochodzących z regionu łódzkiego Polski Centralnej przeprowadzona w zakresie każdego z 30 InDel: HLD6, HLD39, HLD40, HLD45, HLD48, HLD56, HLD58, HLD64, HLD67, HLD70, HLD77, HLD81, HLD83, HLD84, HLD88, HLD92, HLD93, HLD97, HLD99, HLD101, HLD111, HLD114, HLD118, HLD122, HLD124, HLD125, HLD128, HLD131, HLD133, HLD136 badanych za pomocą zestawu multipleksowego Investigator DIPplex, pozwoliła na:

I. Wygenerowanie rozkładów, które znajdują się w równowadze Hardy'ego-Weinberga w obrębie badanego multipleksu, co daje podstawę do używania zestawu Investigator DIPplex w ekspertyzach z zakresu genetyki sądowej oraz obliczeń łącznej wartości dowodowej.

II. Międzypopulacyjna analiza porównawcza rozkładów alleli pozwoliła na ocenę stopnia pokrewieństwa pomiędzy badaną populacją Polski Centralnej a innymi populacjami Europy i świata. W przybliżeniu odzwierciedla ona dystans geograficzny dzielący porównywane populacje oraz stanowi pomocne narzędzie w badaniach biogeograficznych.

III. Wartości obliczonych parametrów statystycznych pozwalają uszeregować badane markery w zakresie ich przydatności do badań w populacji Polski Centralnej zaczynając od najsilniejszego (HLD56) do najsłabszego (HLD84) pod względem siły wykluczenia i siły dyskryminacji, a łączne wartości tych parametrów dla zestawu 30 badanych markerów wynoszą odpowiednio 0,998460242550294 oraz 0,99999999999918. Niska średnia wartość współczynnika wsobności $\phi = -0,0304$ potwierdza niezależność dziedziczenia w badanej populacji.

IV. Ocena praktycznej przydatności zestawu Investigator DIPplex w kontekście przeprowadzonych spraw ojcostwa z podziałem na ekspertyzy potwierdzające i wykluczające ojcostwo potwierdza dużą użyteczność badanych markerów InDel do tego celu. Zestaw ten może być pomocny w trudnych ekspertyzach, które wymagają poszerzenia zakresu badań.

7 Streszczenie

Praca przedstawia badanie 80 osobowej próby populacyjnej niespokrewnionych osób z regionu łódzkiego Polski Centralnej, pozwalające na ocenę częstości występowania określonych cech w zakresie badanych polimorfizmów insercyjno-delecyjnych autosomalnego DNA, będących w składzie zestawu Investigator DIPplex. Uzyskany rozkład genotypów oraz alleli wskazuje na niezależne dziedziczenie markerów. Wykazanie zgodności rozkładów z równowagą Hardy'ego-Weinberga daje możliwość użycia zebranych danych populacyjnych jako bazy pozwalającej przeprowadzić obliczenia wartości dowodowej analiz z zakresu genetyki sądowej.

Porównanie rozkładów cech dla populacji z Europy i świata pozwoliło na ujawnienie określonych rozkładów dla każdego z analizowanych markerów. Jednocześnie odnotowano znaczne różnice w częstościach alleli oraz parametrach statystycznych w oddalonych terytorialnie populacjach. Użycie techniki radialnych drzew umożliwiło pokazanie dystansu genetycznego dzielącego badaną populację od innych populacji Europy i świata. Jest on tym większy im większy jest dystans geograficzny dzielący populacje. Wykonana analiza filogenetyczna pokazuje z pewnym przybliżeniem liczbę wspólnych przodków oraz kolejność rozejść populacji, co może stanowić o przydatności markerów InDel do ustalenia przybliżonego pochodzenia biogeograficznego.

Najwyższe wskaźniki zmienności z zakresie heterozygotyczności, siły dyskryminacji, zmienności genowej, siły wyłączenia, indeksu ojcostwa, wskaźnika polimorfizmu i najniższe wartości prawdopodobieństwa przypadkowej zgodności zaobserwowano dla markerów: HLD70, HLD56, HLD48, HLD64, HLD97. Sprawia to, że te markery są najbardziej przydatne dowodowo w zakresie badań genetyczno-sądowych. Markerami dającymi najmniejszą wartość dowodową okazały się natomiast loci: HLD101, HLD83, HLD114, HLD84.

Wysokie wartości parametrów przydatności tj.: siły wyłączenia i siły dyskryminacji wynoszące odpowiednio 0,998460242550294 oraz 0,99999999999918 oraz niska średnia wartość współczynnika wsobności $\phi = -0,0304$ dają podstawy do uznania markerów z zestawu Investigator DIPplex jako przydatnego narzędzia przy identyfikacji osób oraz analiz pokrewieństwa.

Analizy spraw ojcostwa wykonanych w Pracowni Genetyki Medycznej i Sądowej ZMS UM Łódź dokumentuje średnią skuteczność wyłączenia ojcostwa na poziomie 4,6,

co znaczy, że średnio wykluczamy ojcostwo w zakresie 4-5 markerów wchodzących w skład zestawu Investigator DIPplex. Nie odnotowano natomiast mutacji przy przekazaniu cech rodzic-dziecko w sprawach, w których wcześniej potwierdzono ojcostwo z prawdopodobieństwem granicznym w pewnością, tj powyżej 99,9999%.

Wysoka siła dyskryminacji oraz inne parametry przydatności badanych markerów InDel zestawu Investigator DIPplex dają podstawy do wykorzystywania tego zestawu jako wsparcie markerów typu STR przy rozwiązywaniu trudnych spraw z zakresu identyfikacji osób oraz analizy pokrewieństwa.

8 Piśmiennictwo

1. Butler J.M., *MIST, Fundamentals of Forensic DNA Typing*, Chapter 8, Short Tandem Repeat Marker, Amsterdam: Academic Press, Elsevier, 2010, 147
2. Butler J.M.: *Fundamentals of Forensic DNA Typing*, Introduction, Amsterdam: Academic Press, Elsevier, 2010, 11-13
3. Goodwin W., Linacre A., Hadi S.: *An introduction to forensic genetics*, John Wiley & Sons, 2007, 2-5
4. Wyman A. R., White R., A highly polymorphic locus in human DNA, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980, 77, 6754-6758
5. Butler J.M.: *Fundamentals of Forensic DNA Typing*, Amsterdam: Academic Press, Elsevier, 2010, 4-5
6. The 1000 Genomes Project Consortium: A map of human genome variation from population scale sequencing, *Nature*, 2010, 467(7319), 1061-1073
7. Silva C. V., Matos S., Costa H. A., Morais P., Dos Santos R. M., Amorim A.: Genetic portrait of south Portugal population with InDel markers, *Forensic Sci Int Genet.*, 2013, 7, 101-103
8. 1000 Genomes Project Consortium, Auton A., Brooks L. D., Durbin R. M., Garrison E. P., Kang H. M., Korbel J. O., Marchini J. L., McCarthy S., McVean G. A., Abecasis G. R., A global reference for human genetic variation, *Nature*, 2015, 526, 68-74
9. Butler J.M.: *Fundamentals of Forensic DNA Typing*, Amsterdam: Academic Press, Elsevier, 2010, 147- 151
10. Goodwin W., Linacre A., Hadi S.: *An introduction to forensic genetics*, John Wiley & Sons, 2007, 13-14
11. Walsh P. Sean, Fildes Nicola J., Reynolds Rebecca: *Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA*, Oxford University Press, 1996, 24, 2807-2812
12. Butler J.M.: *Fundamentals of Forensic DNA Typing*, Amsterdam: Academic Press, Elsevier, 2010, 341-349
13. Butler J.M.: *Fundamentals of Forensic DNA Typing*, Amsterdam: Academic Press, Elsevier, 2010, 29

14. Redon R., Ishikawa S., Fitch K. R., Feuk L., Perry G. H. , Andrews T. D., Fiegler H., Shapero M. H., Carson A. R., Chen W., Cho E. K., Dallaire S., Freeman J. L., González J. R., Gratacòs M., Huang J., Kalaitzopoulos D., Komura D., MacDonald J. R., Marshall C. R., Mei R., Montgomery L., Nishimura K., Okamura K., Shen F., Somerville M. J., Tchinda J., Valsesia A., Woodwark C., Yang F., Zhang J., Zerjal T., Zhang J., Armengol L., Conrad D. F., Estivill X., Tyler-Smith C., Carter N. P., Aburatani H., Lee C., Jones K. W., Scherer S. W., Hurles M. E.: Global variation in copy number in the human genome, *Nature*, 2006, 444-454
15. Carvalho Ana, Caine Laura, Carvalho Raquel, Pinheiro Maria F.: Application of indels (investigator DIPplex) in mixture samples, *Forensic Sci Int Genetics Supplement Series 3*, 2011, 351-352
16. Friis Susanne L., Brrsting Claus, Rockenbauer Eszter, Poulsen Lena, Fredslund Stine Frisk, Tomas Carmen, Morling Niels: Typing of 30 insertion/deletions in Danes using the first commercial indel kit- Mentype DIPplex, *Forensic Sci Int Genet.* 6, 2012, 72-74
17. Fondevila M., Phillips C., Santos C., Pereira R., Gusmao L., Carracedo J., Butler M., Lareu M. V., Vallone P. M.: Forensic performance of two insertion- deletion marker assays, *Int J Legal Med*, 2012, 126, 725-737
18. Murthy Vasudeva, Jia Lim Fuey, Samuel Vijaya Paul, Kademane Kumaraswamy: Forensic Identification by Using Insertion-deletion Polymorphisms, *Int J Hum Genet*, 2015, 15(2), 55-59
19. Hollard C., Mendisco F., Keyser C., Crubezy E., Ludes B.: First application of the Investigator DIPplex indels typing kit the analysis of ancient DNA samples, *Forensic Sci Inter Genet Supplement Series 3*, 2011, 393-394
20. LaRue Bobby L., Ge Jianye, King Jonathan L., Budowle Bruce: A validation study of the Qiagen Investigator DIPplex kit; an INDEL- based assay for human identification, *Int J Legal Med*, 2012, 126, 533-540
21. Klein Rebecca, Neumann Cedric, Roy Reena: Detection of insertion/deletion polymorphisms from challenged samples using the Investigator DIPplex[®] Kit, *Forensic Sci Int Genet.* 16, 2015, 29-37
22. Millis R. E., Luttig C. T., Larkins C. E., Beauchamp A., Tsui C., Pittard W. S., Devine S. E.: An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome, *Genome Res*, 2006, 16, 1182-1190

23. Torres Sandra Regina, Uehara C. J., Sutter-Latorre A. F., de Almeida B. S., Sauerbier T. S., Muniz Y. C., Marrero A. R., de Souza I. R.: Population genetic data and forensic parameters of 30 autosomal InDel markers in Santa Catarina State population, Southern Brazil, *Mol Biol Rep*, 2014, 41, 5429-5433
24. Shi Meisen, Liu Yaju, Bai Rufeng, Jiang Lizhe, Lv Xiaojiao, Ma Shuhua: Population data of 30 insertion- deletion markers in four Chinese populations, *Int J Legal Med*, 2015, 129, 53-56
25. Martin Pablo, Garcia Oscar, Heinrichs Beatriz, Yurrebaso Inaki, Aguirre Andoni, Alonso Antonio: Population genetic data of 30 autosomal indels in Central Spain and the Basque Country populations, *Forensic Sci Int Genet.* 7, 2013, 27-30
26. Zidkova Anastasiya, Horinek Ales, Kebrdlova Vera, Korabecna Marie: Application of the new insertion-deletion polymorphism kit for forensic identification and parentage testing on the Czech population, *Int J Legal Med*, 2013, 127, 7-10
27. Shi Meisen, Liu Yaju, Bai Rufeng, Jiang Lizhe, Lv Xiaojiao, Ma Shuhua: Population data of 30 insertion- deletion markers in four Chinese populations, *Int J Legal Med*, 2015, 129, 53-56
28. A&A Biotechnology, Sherlock AX: Zestaw do izolacji genomowego DNA z materiałów o jego śladowej zawartości (plamy krwi, nasienia i śliny, włosy i sierść, tkanki zakonserwowane w parafinie i formalinie, tkanki świeże, krew świeża i mrożona). Procedura z precypitacją DNA, Protokół (wersja 0517), Gdynia, Polska
29. PowerQuantTM System. Introductions for Use of Products PQ5002 and PQ5008. Technical Manual, Promega Corporation, Madison USA, 2015
30. Investigator[®] DIPplex Handbook, Sample & Assay Technologies, 2011
31. Bär W., Brinkmann B., Budowie B., Carracedo A., Gill P, Lincoln P., Mayr W., Olaisen B.: DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. International Society for Forensic Haemogenetics, *Int J Legal Med.*, 1997, 110(4), 175-176
32. Ruitberg C. M., Reeder D. J., Butler J. M.: STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community, *Nucleic Acids Res.*, 2001, 29(1), 320-322, <http://cstl.nist.gov/strbase/multiplx.htm>

33. Komisja Genetyki Sądowej Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii. Zasady atestacji laboratoriów genetycznych przy Polskim Towarzystwie Medycyny Sądowej i Kryminologii na lata 2014-2015, <http://www.ptmsik.pl/komisja-genetyki-sadowej/zasady-atestacji-na-rok-2016>
34. Butler J.M.: Fundamentals of Forensic DNA Typing, Amsterdam: Academic Press, Elsevier, 2010, 36-38
35. Butler J.M.: Fundamentals of Forensic DNA Typing, Amsterdam: Academic Press, Elsevier, 2010, 241
36. Lewis P. O., Zaykin D.: Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data, 2001, GDA version 1.0 (d16c) <http://en.bio-soft.net/dna/gda.html>
37. Zaykin D., Zhivotovsky L., Weir B. S.: Exact tests for association between alleles at arbitrary numbers of loci, *Genetica*, 1995, 96(1-2), 169-178
38. Bland J. M., Altman D. G.: Multiple significance tests: the Bonferroni method, *BMJ*, 1995, 310, 170
39. Wright S.: The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating, *Evolution*, 1965, 19, 395-420
40. Reynolds John, Weir B. S., Cockerham C. Clark: Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance, *Genetics*, 1983, 105, 767-779
41. Liu J., Muse S. V.: PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis, *Bioinformatics*, 2005, 21 (9), 2128-2129
42. Weir B. S.: Genetic Data Analysis II, Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, 1996
43. Tereba A., Promega Corporation: Tools for analysis of population statistics. Profiles in DNA, Promega, 1999, 2, 14-16
44. Page R. D.: TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers, *Comput. Appl. Biosci.*, 1996, 12, 357-358
45. STATISTICA StatSoft, Inc, 2016, version 12.5
46. Pepinski Witold, Abreu-Głowacka Monica, Koralewska- Kordel Małgorzata, Michalak Eliza, Kordel Krzysztof, Niemcunowicz-Janica Anna, Szeremeta Michał, Konarzewska Magdalena: Population genetics of 30 INDELs in populations of Poland and Taiwan, *Mol Biol Rep*, 2013, 40, 4333-4338
47. Qiagen: Population Data for analysis of results from the Investigator DIPplex Kit, 2010

48. Tomas C., Poulsen L., Drobnič K., Ivanova V., Jankauskiene J., Bunokiene D., Børsting C., Morling N.:Thirty autosomal insertion-deletion polymorphisms analyzed using the Investigator® DIPplex Kit in populations from Iraq, Lithuania, Slovenia, and Turkey, *Forensic Sci Int Genet.* 2016, 25, 142-144
49. Turrina Stefania, Filippini Giulia, De Leo Domico: Forensic evaluation of the Investigator DIPplex typing system, *Forensic Sci Int Genet. Supplement Series,* 2011, 3, 331-332
50. Saiz M., André F., Pisano N., Sandberg N., Bertoni B., Pagano S.:Allelic frequencies and statistical data from 30 INDEL loci in Uruguayan population, *Forensic Sci Int Genet* 2014, 9, 27-29
51. Ferreira Palha T. J. B., Ribeiro Rodrigues E. M., Cavalcante G. C., Marrero A., de Souza I. R., Seki Uehara C. J., Silveira da Motta C. H. A., Koshikene D., da Silva D. A., de Carvalho E. F., Chemale G., Freitas J. M., Alexandre L., Soler M. P., Santos S.:Population genetic analysis of insertion-deletion polymorphisms in a Brazilian population using the Investigator DIPplex kit, *Forensic Sci Int Genet.* 2015, 19, 10-14
52. Seong K. M., Park J. H., Hyun Y. S., Kang P. W., Choi D. H., Han M. S., Park K. W., Chung K. W.:Population genetics of insertion-deletion polymorphisms in South Koreans using Investigator DIPplex kit, *Forensic Sci Int Genet.* 2014, 8, 80-83
53. Shen Chunmei, Zhu Bofeng, Yao Tianhua, Li Zhidan, Zhang Yudang, Yan Jiangwei, Wang Bo, Bie Xiaohua, Tai Fadao, A 30-InDel Assay for Genetic Variation and Population Structure Analysis of Chinese Tujia Group, *Scientific Reports,* 1016, 6, 1-7
54. Kis Zoltán, Kozma Zsolt, Domján Lajos, Pamjav Horolma:Gemone deletion and insertion polymorphisms (DIPs) in the Hungarian population, *Forensic Sci Int Genet.* 2012, 6, 125-126
55. Neuvonen Anu M., Palo Jukka U., Hedman Minttu, Sajantila Antti: Discrimination power of Investigator DIPplex loci in Finish and Somali populations, *Forensic Sci Int Genet.* 6, 2012, 99-102
56. Mielnik-Sikorska Marta, Daca Patrycja, Malyarchuk Boris, Derenko Miroslava, Skonieczna Katarzyna, Perkova Maria, Dobosz Tadeusz, Grzybowski Tomasz: The History of Slavs Inferred from Complete Mitochondrial Genome Sequences, *PLOS ONE,* 2013, 8 (1), 1-11

57. Immel Uta-Dorothee, Krawczyk Michael, Udolph Jürgen, Richter Angela, Rodig Heike, Kleiber Monfred, Klintschar Michael: Y-chromosomal STR haplotype analysis reveals surname-associated strata in the East-German population, *European Journal of Human Genetics*, 2006, 14, 577-582
58. National Research Council (U. S.). Committee on DNA Forensic Science: an Update. National Reserch Council (U. S.). Commission on DNA Forensic Science: An Update, The evaluation of forensic DNA evidence, National Academy Press, Washington, D.C., 1996

9 Spis rycin

1. Rycina 1. Schemat przedstawiający strukturę polimorfizmów w zakresie zmiennej liczby kopi w genomie (CNVs).
2. Rycina 2. Wyniki badań polimorfizmu insercyjno-delecyjnego w zakresie 30 układów wchodzących w skład multipleksu Investigator DIPplex (Qiagen) znakowanych czterema barwnikami fluorescencyjnymi uzyskane dla przykładowego mężczyzny.
3. Rycina 3. Wzorzec polimorfizmów insercyjno-delecyjnych w obrębie 30 markerów autosomalnego DNA oraz genu amelogeniny z zestawu Investigator DIPplex (Qiagen) znakowany czterema barwnikami fluorescencyjnymi, Investigator DIPplx Handbook For multiplex amplification of 30 deletion/insertion polymorphisms, plus Amelogenin, 2014, 11, 58
4. Rycina 4. Częstość występowania insercji/delecji 30 markerów InDel multipleksu Investigator DIPplex w próbie populacyjnej liczącej 80 niespokrewnionych osób z badanego regionu Polski Centralnej
5. Rycina 5-7. Porównanie wartości heterozygotyczności (HET) uzyskanych dla markerów z zestawu Investigator DIPplex w badanej populacji regionu łódzkiego z innymi populacjami Polski i świata
6. Rycina 8-10. Porównanie wartości heterozygotyczności (HET) uzyskanych dla markerów z zestawu Investigator DIPplex w badanej populacji regionu łódzkiego z innymi populacjami Polski i świata
7. Rycina 11-13. Porównanie wartości heterozygotyczności (HET) uzyskanych dla markerów z zestawu Investigator DIPplex w badanej populacji regionu łódzkiego z innymi populacjami Polski i świata
8. Rycina 14-16. Porównanie wartości siły dyskryminacji (PD) uzyskanych dla markerów zestawu Investigator DIPplex w populacji regionu łódzkiego z innymi populacjami
9. Rycina 17-19. Porównanie wartości siły dyskryminacji (PD) uzyskanych dla markerów zestawu Investigator DIPplex w populacji regionu łódzkiego z innymi populacjami

10. Rycina 20-22. Porównanie wskaźnika informacji o polimorfizmie (PIC) uzyskanych dla markerów zestawu Investigator DIPplex w populacji Polski z innymi populacjami
11. Rycina 23-25. Porównanie wskaźnika informacji o polimorfizmie (PIC) uzyskanych dla markerów zestawu Investigator DIPplex w populacji Polski z innymi populacjami
12. Rycina 26-28. Porównanie prawdopodobieństwa przypadkowej zgodności (MP) uzyskanych dla markerów zestawu Investigator DIPplex w populacji Polski z innymi populacjami
13. Rycina 29-31. Porównanie prawdopodobieństwa przypadkowej zgodności (MP) uzyskanych dla markerów zestawu Investigator DIPplex w populacji Polski z innymi populacjami
14. Rycina 32-34. Zestawienie siły wykluczenia (PE) oceniającej przydatność badanych markerów do badań ojcostwa w populacji Polski w zestawieniu z innymi populacjami Europy i świata
15. Rycina 35-37. Typowy indeks ojcostwa (TPI) uzyskany w zakresie 30 markerów InDel zestawu Investigator Qiagen w populacji regionu łódzkiego oraz w populacjach Europy i świata
16. Rycina 38. Radialne drzewo skonstruowane w oparciu o dystans genetyczny dzielący populację Polski od innych populacji świata z użyciem metody przyłączania sąsiada skonstruowany w oparciu o rozkład 30 markerów InDel zestawu Investigator DIPplex
17. Rycina 39. Skalowanie wielowymiarowe obrazujące dystans genetyczny pomiędzy badaną populacją Polski Centralnej a innymi populacjami Europy i świata na wykresie dwuwymiarowym, uzyskanym w oparciu o rozkład 30 markerów zestawu Investigator DIPplex w programie STATISTICA v.12.5
18. Rycina 40. Skalowanie wielowymiarowe obrazujące dystans genetyczny pomiędzy badaną populacją Polski a innymi populacjami Europy na wykresie trójwymiarowym uzyskane w oparciu o rozkład 30 markerów insercyjno-delecyjnych
19. Rycina 41. Porównanie skuteczności wyłączenia ojcostwa uzyskanych dla poszczególnych markerów InDel zestawu Investigator DIPplex w oparciu o analizę 10 spraw z wykluczeniem ojcostwa

20. Rycina 42. Odsetek spraw z wykluczeniem ojcostwa uzyskanych w zakresie od 3 do 9 loci insercyjno-delecyjnych po badaniu zestawem Investigator DIPplex w populacji Polski centralnej.

10 Spis tabel

1. Tabela 1. Charakterystyka wykorzystanych w pracy polimorfizmów insercyjno-delecyjnych opracowana na podstawie [30]
2. Tabela 2. Zestawienie częstości występowania insercji dla 30 markerów InDel multipleksu Investigator DIPplex w 22 populacjach niespokrewnionych osób z badanego regionu łódzkiego Polski Centralnej [7,16,17,23,25,27,46-53,55].
3. Tabela 3. Parametry biostatystyczne oraz analiza równowagi Hardy'ego i Weinberga dla 30 markerów InDel zestawu Investigator DIPplex ujawnione na podstawie analizy prób pochodzących od 80 niespokrewnionych osób z Polski Centralnej