

POLIMORFIZM GENETYCZNY 27 MARKERÓW DNA CHROMOSOMU Y W PRÓBIE POPULACYJNEJ POLSKI PÓLNOCNO-WSCHODNIEJ

GENETIC POLYMORPHISM OF 27 Y-CHROMOSOME DNA MARKERS IN A POPULATION SAMPLE FROM NORTHEASTERN POLAND

STRESZCZENIE

Niniejsza praca doktorska dotyczy analizy genetycznej mężczyzn zamieszkujących północno-wschodnią Polskę, z wykorzystaniem zestawu Yfiler Plus, który umożliwia badanie 27 markerów Y-STR, w tym siedem markerów szybko mutujących, na podstawie których możliwa jest analiza różnicująca mężczyzn spokrewnionych w linii ojcowskiej. W badaniu przeanalizowano próbki DNA 534 niespokrewnionych mężczyzn w wieku od 16 do 62 lat. Próbkę DNA pochodziły z wymazów nabłonka jamy ustnej oraz krwi zasuszonej na bibule. Ekstrakcję DNA przeprowadzono z użyciem zestawu GeneMATRIX Bio-Trace DNA Purification Kit, a ocena jakości i ilości materiału DNA została wykonana za pomocą zestawu Quantifiler Human DNA Quantification Kit. Wyniki walidacji zestawu Yfiler Plus wykazały, że metoda spełnia wszystkie wymagania postawione w założonych kryteriach akceptacji. Czulość analizy, wyznaczona doświadczalnie, odpowiadała założonym normom, co potwierdzono w pełnych profilach genetycznych uzyskanych dla zakresu DNA od 1,000 do 0,125 ng. Poniżej stężenia 0,062 ng liczba nieoznaczonych markerów wzrastała, a przy stężeniu 0,031 ng oznaczano jedynie pojedyncze markery, co czyniło te wyniki nieodpowiednimi do interpretacji. Wartość ST dla interpretacji profili Yfiler Plus ustalono na poziomie 550 rfu, natomiast poziom wykrywalności LOD - został określony na 50 rfu, a poziom oznaczalności LOQ na 150 rfu. Analiza proporcji DNA męskiego do żeńskiego wykazała, że przy stosunku 1:1000 utrata alleli składnika mniejszościowego (żeńskiego) była zauważalna, a przy proporcji 1:8000 nie oznaczono markerów Y-STR. Wyniki badań wskazują również na wysoką zgodność wyników uzyskanych przy użyciu zestawów Yfiler Plus oraz PowerPlex Y23. Jakość profili elektroforetycznych była porównywalna, co świadczy o precyzji i czulości metody. Uzyskane wyniki badań walidacyjnych pozwalają na stwierdzenie, iż zestaw Yfiler Plus PCR Amplification Kit w zakresie przydatności w identyfikacyjnych badaniach genetycznych wykonywanych w Pracowni DNA ZMS na UMB, przeszedł walidację pozytywnie. Badania walidacyjne są zgodne z wytycznymi SWGDAM.

Analizy wielowymiarowego skalowania (MDS) oraz wariancji molekularnej (AMOVA) wykazały bliskie pokrewieństwo genetyczne z populacjami Litwy, Węgier i Rosji. Dodatkowo, badania wzbogaciły globalną bazę YHRD o 534 nowe haplotypy, co zwiększa precyzję analiz genetycznych w kontekście badań genetyczno-sądowych oraz genealogicznych. Zastosowanie zestawu Yfiler Plus okazało się skutecznym narzędziem w analizach kryminalistycznych, szczególnie przy badaniu śladów zawierających małe ilości męskiego DNA. Wysoka zdolność dyskryminacyjna zestawu, z wartością DC na poziomie 99,25%, potwierdza jego użyteczność w praktyce genetyki sądowej. Wyniki badań sugerują konieczność dalszych analiz na większych próbach z innych regionów Polski, co pozwoliłoby uzyskać jeszcze bardziej szczegółowy obraz zróżnicowania genetycznego populacji. Odkrycia dotyczące chromosomu Y pomagają nie tylko w rozumieniu historii ewolucyjnej i demograficznej ludzkości, ale również wnoszą znaczący wkład w genetykę sądową, umożliwiając dokładniejszą identyfikację i analizę w kontekście prawnym i historycznym. Wraz z postępem technologicznym i metodologicznym, badania te nadal będą ewoluować, oferując nowe możliwości i perspektywy w wielu dziedzinach nauki.

ABSTRACT

This doctoral dissertation focuses on the genetic analysis of men residing in northeastern Poland using the Yfiler Plus kit, which allows for the study of 27 Y-STR markers, including seven rapidly mutating markers, enabling the differentiation of men related through the paternal line. In the study, DNA samples from 534 unrelated men aged 16 to 62 were analyzed. The DNA samples were collected from buccal epithelial swabs and dried blood on filter paper. DNA extraction was performed using the GeneMATRIX Bio-Trace DNA Purification Kit, and the quality and quantity of the DNA material were assessed using the Quantifiler Human DNA Quantification Kit. The results of the Yfiler Plus kit validation demonstrated that the method met all the criteria set in the acceptance guidelines. The sensitivity of the analysis, determined experimentally, matched the established standards, as confirmed by full genetic profiles obtained for DNA quantities ranging from 1,000 ng to 0.125 ng. Below the concentration of 0.062 ng, the number of undetected markers increased, and at 0.031 ng, only single markers were detected, making these results unsuitable for interpretation. The ST value for interpreting Yfiler Plus profiles was set at 550 rfu, while the limit of detection (LOD) was established at 50 rfu, and the limit of quantification (LOQ) at 150 rfu. The analysis of male-to-female DNA ratios

revealed that at a ratio of 1:1000, the loss of alleles from the minority component (female) was noticeable, and at a ratio of 1:8000, Y-STR markers were not detected. The study results also indicated high concordance between the results obtained using the Yfiler Plus and PowerPlex Y23 kits. The quality of the electrophoretic profiles was comparable, indicating the precision and sensitivity of the method. The results of the validation studies allow for the conclusion that the Yfiler Plus PCR Amplification Kit, in terms of its suitability for genetic identification studies conducted at the UMB DNA Laboratory, passed the validation successfully. The validation studies comply with SWGDAM guidelines. Multidimensional scaling (MDS) and molecular variance (AMOVA) analyses demonstrated a close genetic relationship with the populations of Lithuania, Hungary, and Russia. Additionally, the research enriched the global YHRD database with 534 new haplotypes, increasing the precision of genetic analyses in forensic and genealogical contexts. The use of the Yfiler Plus kit proved to be an effective tool in forensic analyses, particularly in the study of traces containing small amounts of male DNA. The high discriminatory power of the kit, with a DC value of 99.25%, confirms its usefulness in forensic genetics practice. The study results suggest the need for further analyses on larger samples from other regions of Poland, which would provide an even more detailed picture of the genetic diversity of the population. Discoveries related to the Y chromosome not only aid in understanding the evolutionary and demographic history of humanity but also make a significant contribution to forensic genetics, enabling more accurate identification and analysis in legal and historical contexts. As technological and methodological advancements continue, these studies will evolve, offering new opportunities and perspectives in many fields of science.

16.10.2024r. Agnieszka Serwańska