

**Patrycja Daca, Marta Mielnik, Urszula Rogalla, Katarzyna Skonieczna,  
Katarzyna Linkowska, Tomasz Grzybowski**

## Zastosowanie reakcji minisekwencjonowania do oznaczania przynależności haplogrupowej mitochondrialnego DNA

### **The application of minisequencing reactions for haplogroup assignment of mitochondrial DNA**

Z Katedry Medycyny Sądowej UMK w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Kierownik: prof. dr hab. med. K. Śliwka

W ostatnim czasie obserwuje się wzrost zainteresowania polimorfizmem jednonukleotydowym (ang. Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs) mitochondrialnego DNA (mtDNA), nie tylko w badaniach populacyjnych, ale również w genetyce sądowej. Ciągły rozwój technik biologii molekularnej oraz powiększający się zasób wiedzy filogenetycznej umożliwiają coraz szybsze i dokładniejsze oznaczanie dużej liczby SNPs w obrębie genomu mitochondrialnego. Spośród technik stosowanych do analizy SNPs na szczególną uwagę zasługuje metoda minisekwencjonowania. Z uwagi na wysoką czułość tej metody i szybkość wykonywanych nią oznaczeń, jest ona coraz częściej stosowana w laboratoriach genetyczno-sądowych na całym świecie. Niniejsza praca stanowi przegląd istniejących systemów minisekwencjonowania stosowanych do oznaczania przynależności haplogrupowej mtDNA z populacji Europy, Azji wschodniej oraz u rdzennych Amerykanów.

In the last few years, one could observe an increased interest in mitochondrial DNA (mtDNA) single nucleotide polymorphisms (SNPs) as a result of their numerous applications in population genetics and forensic science. Continuous progress in molecular technologies together with an increasing body of phylogenetic knowledge, based mainly on complete mitochondrial genome sequencing, allows both for selection and accurate typing of many

SNPs in mitochondrial DNA. Among the SNP typing techniques, due to its high sensitivity and promptness of determinations, minisequencing appears to be one of the fastest and most frequently applied methods in forensic laboratories. This review presents currently available minisequencing systems used for haplogroup assignment of mtDNA in European, East Asian and Native American populations.

**Słowa kluczowe:** mitochondrialny DNA, filogeografia, polimorfizmy jednonukleotydowe, minisekwencjonowanie

**Key words:** mitochondrial DNA, phylogeography, single nucleotide polymorphisms, minisequencing

#### **WSTĘP**

Analiza sekwencji mitochondrialnego DNA stała się jednym z wartościowych narzędzi w badaniach genetycznych przeprowadzanych dla potrzeb wymiaru sprawiedliwości. Za sprawą dużej liczby cząsteczek w komórce oraz wysokiej odporności na degradację, mitochondrialny DNA stał się szczególnie użytecznym markerem, stosowanym do badań śladów biologicznych zawierających zdegradowany materiał genetyczny oraz w przypadkach identyfikacji ofiar

przestępstw czy katastrof [1, 2]. Z kolei duża zmienność mtDNA wewnątrz populacji wynikająca z około dziesięciokrotnie wyższego tempa mutacji w porównaniu z jądrowym DNA, a także brak rekombinacji i dziedziczenie w linii żeńskiej czynią z mtDNA doskonały marker do badań antropologicznych i ewolucyjnych [2, 3]. Analiza krótkiego fragmentu cząsteczki DNA (regionu kontrolnego) pozwala wykazać różnice pomiędzy osobami, z kolei analiza sekwencji całego genomu dostarcza informacji na temat ewolucyjnego pochodzenia ludzkości oraz szlaków migracji człowieka współczesnego [2, 4]. W badaniach filogenetycznych haplotypy mtDNA o określonym wzorze sekwencji, odziedziczonym od wspólnego przodka, skupione są w monofiletyczne grupy określane mianem kładów bądź haplogrup, definiowanych za pomocą określonych polimorfizmów regionu kodującego w powiązaniu z charakterystycznymi wariantami regionu kontrolnego (HVS I oraz HVS II). Dane pochodzące wyłącznie z sekwencjonowania regionu kontrolnego, a zwłaszcza z jego wybranych fragmentów, nie zawsze wystarczają do określenia przynależności haplogrupowej mtDNA. Przykładowo, większość podgrup w obrębie najczęstszej w Europie haplogrupy H definiowana jest poprzez mutacje regionu kodującego, a nie kontrolnego [5]. Dodatkowo szybkie tempo substytucji zachodzących w regionie kontrolnym oraz zjawisko homoplazji (pojawianie się równoległych mutacji oraz rewersji) mogą prowadzić do mylnej interpretacji uzyskanych wyników, na przykład notowany w populacjach słowiańsko-języcznych haplotyp HVS I/HVS II 16311C-263G-315.1C oraz jego pochodne mogą należeć zarówno do haplogrupy H, jak i HV3 [6, 7].

Rozdzielczość analiz można zwiększyć poprzez sekwencjonowanie pełnych genomów mitochondrialnych. W ostatnim czasie dokonał się bardzo znaczący postęp w dziedzinie genomiki mitochondrialnej – opublikowano tysiące sekwencji pełnych genomów z populacji wszystkich kontynentów, co pozwoliło na stosunkowo precyzyjną rekonstrukcję filogenezy ludzkiego mtDNA na skalę globalną. Zebrania i podsumowania dotychczasowych danych na ten temat dokonali w ostatnim czasie m.in. van Oven i Kayser [8]. Niestety sekwencjonowanie pełnych genomów jest nadal kosztowne i stosunkowo czasochłonne, toteż wysiłki wielu zespołów badawczych, zainteresowanych określaniem przynależności haplogrupowej mtDNA, skoncentrowały się na selekcji i ograniczonym typowaniu markerów

SNPs. Doskonałym ich źródłem jest kodujący region mtDNA, zwłaszcza w sytuacji, kiedy znana jest filogeneza głównych haplogrup i podhaplogrup mitochondrialnych. Określanie specyficznych haplogrupowo wariantów SNPs w obrębie regionu kodującego w znaczący sposób poprawiło rozdzielczość badań populacyjnych i identyfikacyjnych. Wzrost zainteresowania markerami SNP wiąże się również ze znacznie szybszym i łatwiejszym w stosunku do tradycyjnych metod sekwencjonowania generowaniem danych oraz stosunkowo łatwą implementacją technologii w laboratorium. Ponadto dla aplikacji sądowych istotne znaczenie ma fakt, iż analizy SNPs mogą być przeprowadzane na bardzo krótkich amplikonach, a zatem również w przypadku częściowej degradacji pozyskanego materiału biologicznego [3]. Istnieje szereg nowoczesnych metod umożliwiających wykrywanie polimorfizmów jednonukleotydowych (SNPs), takich jak ilościowy PCR w czasie rzeczywistym z zastosowaniem molekularnych sond TaqMan, oligonukleotydowa reakcja ligacji (OLA) czy też spektrometria masowa (MALDI-TOF). Jednakże zarówno dla potrzeb sądowych, jak i populacyjnych, istotne znaczenie mają nie tylko szybkość wykonywanych analiz, ich wysoka czułość i powtarzalność, ale także stosunkowo niskie koszty [3, 4, 9]. Narzędziem idealnie spełniającym te wymagania jest reakcja minisekwencjonowania. Jest ona oparta na zastosowaniu nieznakowanego startera zaprojektowanego tak, by miejsce mutacji bezpośrednio przylegało do jego końca 3'. W kolejnym etapie reakcji starter jest wydłużany przez pojedynczy, znakowany fluorescencyjnie dideoksynukleotyd. Każdy ze stosowanych ddNTPs wyznakowany jest innym barwnikiem fluorescencyjnym, dzięki czemu możliwe jest rozróżnienie poszczególnych pozycji nukleotydowych. Zaletą reakcji minisekwencjonowania jest możliwość detekcji wielu SNPs jednocześnie w reakcji multipleksowej. Do końca 5' startera przyłączony jest wówczas różnej długości tzw. „ogon” poli T, który pozwala na łatwy rozdział produktów poprzez elektroforezę kapilarną [3, 4, 9, 10].

#### OKREŚLANIE PRZYNALEŻNOŚCI HAPLOGRUPOWEJ Z WYKORZYSTANIEM REAKCJI MINISEKWENCJONOWANIA

Częstości różnych haplogrup mitochondrialnego DNA wykazują znaczne zróżnicowanie kontynentalne, przypisywane działaniu dryfu genetycznego oraz selekcji naturalnej. Dużą

różnorodność obserwuje się również wewnątrz haplogrup w obrębie poszczególnych populacji, przy czym najwyższy poziom osiąga ona w populacji afrykańskiej. System minisekwencjonowania stosowany do klasyfikacji haplogrupowej powinien uwzględniać filogeograficzne zależności, tj. powinien być skonstruowany w taki sposób, aby umożliwić dokonanie klasyfikacji mtDNA w obrębie populacji danego kontynentu lub jego części.

Zestaw specyficznych haplogrupowo wariantów polimorficznych SNPs umożliwia dokonanie dyskryminacji na poziomie sub-kontynentalnym, różnicując populacje zachodniej i wschodniej Eurazji. Do tej pory zoptymalizowano kilka multipleksowych reakcji minisekwencjonowania, które z powodzeniem mogą być stosowane zarówno do celów sądowych, jak i antropologicznych [11]. Spośród nich na uwagę zasługuje reakcja „West-Eurasia-Plex”, na którą składa się panel zawierający 16 markerów SNP zlokalizowanych w regionie kodującym mtDNA, definiujących 9 głównych haplogrup zachodnio-eurazjatyckich: H, I, J, K, T, U, V, W, X [12]. Zestaw skonstruowano wybierając przede wszystkim mutacje znajdujące się poza genami kodującymi białka bądź też mutacje synonimiczne. Kierowano się tutaj postulatami natury etycznej, według których testy stosowane w genetyce sądowej powinny dotyczyć przede wszystkim niekodujących fragmentów genomu człowieka [2]. W zestawie „West-Eurasia-Plex” wielkość fragmentów amplifikowanych przed właściwą reakcją minisekwencjonowania nie przekracza 100 p.z., co jest niewątpliwą zaletą w przypadku zdegradowanego DNA [12]. Konstrukcja reakcji opierała się na założeniu, iż tranzycja w pozycji 7028 różnicuje haplogrupę H oraz pozostałe haplogrupy. Te ostatnie definiowane są następnie na podstawie specyficznych haplogrupowo polimorfizmów. W celu identyfikacji haplogrup wywodzących się z makrohaplogrupy N za pośrednictwem R, zestaw Brandstätter i wsp. [12] wykorzystuje polimorfizmy C15904T dla V; G12372A i C14766T dla U; A1811G, G12372A, C14766T i T14798C dla K (jest to podgrupa w obrębie haplogrupy U); A11251G, G13708A i C14766T dla J oraz G709A, G8697A, A11251G i C14766T dla T (J i T są haplogrupami siostrzanymi, tj. wywodzącymi się z jednego węzła). Omawiany zestaw pozwala również na identyfikację haplogrupy W za pomocą tranzycji G709A, G8251A i C14766T; X na podstawie motywu G1719A i C14766T oraz I poprzez tranzycję G1719A, G8251A i C14766T.

„West-Eurasia-Plex” pozwala również na oznaczanie haplogrup H1 (G3010A) oraz H3 (T6776C), najczęstszych w Europie podkladów haplogrupy H.

Uzupełnieniem multipleksu „West-Eurasia-Plex” jest zestaw markerów jednonukleotydomy zaproponowany przez Coble i wsp. [2]. Metoda oparta na reakcji minisekwencjonowania przewiduje typowanie 59 markerów SNPs, wyselekcjonowanych na podstawie doniesień naukowych. Są one zebrane w ośmiu multipleksowych panelach i pozwalają na oznaczanie szeregu podkladów w obrębie europejskich haplogrup – HV, JT oraz K [2]. Niewątpliwą zaletą systemu opracowanego przez Coble i wsp. [2] jest zastosowanie różnych kombinacji wariantów polimorficznych charakteryzujących haplogrupy występujące z największą częstością w Europie, co znacznie poprawia rozdzielczość oznaczeń. Jednakże z uwagi na ograniczenia reakcji multipleksowych nie wszystkie SNPs różnicujące daną haplogrupę udało się zebrać w pojedynczym panelu, dlatego niektóre z pozycji polimorficznych umieszczone zostały w kilku różnych multipleksach. System opracowany przez Coble i wsp. [2] służy raczej do rozróżniania częstych haplotypów regionu kontrolnego za pomocą dodatkowych markerów regionu kodującego, nie zaś do kompleksowej klasyfikacji haplogrupowej nieznanymi próbek mtDNA. Został on więc zaprojektowany z myślą o zastosowaniach typowo identyfikacyjnych, jako uzupełnienie rutynowo stosowanych analiz sekwencji regionu kontrolnego.

Jako że wiedza na temat markerów specyficznych haplogrupowo wciąż rośnie, kolejne zespoły badawcze opracowują systemy umożliwiające coraz szybsze i dokładniejsze oznaczanie haplogrup na podstawie polimorfizmów regionu kodującego. Mikkelsen i wsp. [13] zaproponowali reakcję minisekwencjonowania, która w jednym zestawie multipleksowym różnicuje główne haplogrupy zachodniej Eurazji, natomiast w drugim wyodrębnia podklady w obrębie haplogrupy H. Rozdzielczość pierwszego panelu opracowanego przez cytowanych autorów jest większa niż w przypadku zestawu „West-Eurasia-Plex”, pozwala on bowiem na rozróżnienie szeregu podhaplogrup w obrębie głównych kładów europejskich – U2, U4, U5, K2a, J1b, J1c. Warto jednak zwrócić uwagę, że z wyjątkiem K2a wszystkie one są możliwe do zidentyfikowania na podstawie diagnostycznych polimorfizmów regionu kontrolnego. Haplogrupę H charakteryzuje natomiast wysoka, bo

sięgająca ok. 40-50%, częstość występowania w populacjach europejskich oraz bardzo szeroki zasięg geograficzny. Jednocześnie jej wewnętrzne zróżnicowanie jest możliwe do zidentyfikowania poprzez sekwencjonowanie regionu kontrolnego tylko w niewielkim stopniu – na podstawie SNPs tego regionu można oznaczyć w sposób niebudzący większych wątpliwości jedynie podkłady H1a, H6 i H15 [5]. Tymczasem w obrębie haplogrupy H, zdefiniowanej na podstawie tranzykcji w pozycjach 2706 oraz 7028, w populacjach Europy, Bliskiego Wschodu i Kaukazu scharakteryzowano do tej pory 21 podkładów (H1-H21), a większość z nich obejmuje szereg drobniejszych odgałęzień [5, 14]. Drugi z paneli opracowanych przez Mikkelsena i wsp. [13] pozwala na identyfikację szeregu podhaplogrup w obrębie H-H1, H1a, H1b, H2a1, H3, H3a, H5a, H5a1, H6a1, H7, H13a1a1, H15 oraz H16.

Najbardziej szczegółowej analizie haplogrupy H dokonali do tej pory Brandstätter i wsp. [15]. Kierując się aktualną wiedzą na temat filogenezy tej haplogrupy wyselekcjonowali oni 45 polimorfizmów jednonukleotydowych, a następnie opracowali metodę ich oznaczania za pomocą dwóch multipleksowych zestawów PCR oraz trzech reakcji minisekwencjonowania z wykorzystaniem znakowanych fluorescencyjnie dideoksynukleotydów. Haplogrupę H oznaczano na podstawie wspomnianych wcześniej pozycji SNPs, a w dalszej kolejności różnicowano na główne podgrupy występujące w Europie (H1-H17) oraz szereg mniejszych podkładów. Metoda ta z powodzeniem może być stosowana zarówno dla celów przesiewowych, a więc wstępnego, filogenetycznego typowania próbek, jak i szczegółowej analizie poszczególnych podgrup w obrębie haplogrupy H [15].

Analiza rozkładu częstości poszczególnych haplogrup w obrębie populacji europejskiej pozwala stwierdzić, iż w puli mitochondrialnego DNA Europy pojawiają się również haplogrupy charakterystyczne dla wschodniej Eurazji, choć z niskimi częstościami (łącznie ok. 1.5%). Przykładowo, w populacji polskiej i rosyjskiej zanotowano obecność wschodnio-euroazjatyckich haplogrup Z1, C5c1, D5a3 czy G2a [6, 16, niepublikowane dane autorów pracy]. Alvares-Iglesias i wsp. [17] opracowali reakcję minisekwencjonowania, w której oznaczane są 32 markery SNPs z obszaru kodującego mtDNA, charakteryzujące główne haplogrupy azjatyckie i rdzennie amerykańskie. Filogenetyczna klasyfikacja opiera się w tym przypadku na zróżnicowaniu dwóch makrohaplogrup N i M na podstawie dwóch tranzykcji

– odpowiednio w pozycjach 10398 i 10400. Obie wspomniane makrohaplogrupy mają prawie jednakowy udział w całkowitej puli mtDNA w Eurazji wschodniej. Spośród kładów wywodzących się bezpośrednio z makrohaplogrupy N, omawiany zestaw umożliwia oznaczenie haplogrupy A2 występującej w populacjach okołobiegunowych, charakterystycznej dla niektórych grup Indian amerykańskich haplogrupy X2a oraz azjatyckiej haplogrupy N9 wraz z jej podgrupami N9a, N9a1 oraz N9a4. W obrębie wywodzącej się z N makrohaplogrupy R definiowanej na podstawie tranzykcji w pozycji 12705, wyróżniono dwie główne gałęzie – B oraz R9 [17]. Haplogrupa B, poza dziewięcionukleotydową delecją w pozycjach 8281-8289, została dość szczegółowo oznaczona przez włączenie wariantów SNPs definiujących jej podgrupy B4b, B4c oraz B4f. Z kolei w obrębie R9 zestaw umożliwia oznaczenie podhaplogrup R9b i F. Wewnątrz tej ostatniej możliwe jest oznaczenie trzech głównych podkładów F1, F2, F3, z czego F1 i F3 jest podzielony na mniejsze podgrupy. Zestaw opracowany przez cytowanych autorów pozwala również na oznaczanie szeregu haplogrup wywodzących się bezpośrednio z makrohaplogrupy M – M7, M8 (wraz z jednym z jej dobrze znanych podkładów – C), M9, M10, M11, M12'G oraz D. W obrębie tej ostatniej wyodrębniono charakteryzującą się największym wewnętrznym zróżnicowaniem w populacjach azjatyckich haplogrupę D4, wraz z jej rdzennie amerykańskim podkładem D1 [17]. Omówiona reakcja jest z pewnością najpełniejszym opracowanym dotychczas testem pozwalającym na szybką identyfikację wschodnio-euroazjatyckich i rdzennie amerykańskich haplogrup mtDNA na podstawie wybranych wariantów SNPs regionu kodującego. Jednocześnie jednak warto zwrócić uwagę, że odzwierciedla ona jedynie niewielką część zróżnicowania mtDNA u mieszkańców wschodniej Azji oraz Indian amerykańskich, poznanego do tej pory dzięki sekwencjonowaniu pełnych genomów [18, 19, 20, 21]. Warto również podkreślić, że nie opracowano dotychczas testów opartych na minisekwencjonowaniu, które umożliwiłyby rozpoznawanie chociaż części ogromnego zróżnicowania mtDNA w populacjach afrykańskich [22].

Można się spodziewać, że w miarę dalszego rozwoju genomiki mitochondrialnej, tj. poznawania sekwencji kolejnych pełnych genomów, będzie wzrastała także liczba testów opartych na minisekwencjonowaniu, zwiększających rozdzielczość rutynowych analiz mtDNA zarówno w genetyce populacyjnej, jak i sądowej.

## PIŚMIENNICTWO

1. Parson W., Bandelt H. J.: Extended guidelines for mtDNA typing of population data in forensic science. *Forensic Sci. Int.: Genetics* 2007, 1, 13-19.
2. Coble M. D., Just R. S., O'Callaghan J. E., Letmanyi I. H., Peterson C. T., Irwin J. A., Parsons T. J.: Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *Int. J. Legal Med.* 2004, 117, 137-146.
3. Vallone P. M., Just R. S., Coble M. D., Butler J. M., Parsons T. J.: A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *Int. J. Legal Med.* 2004, 118, 147-157.
4. Sobrino B., Brión M., Carracedo A.: SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci. Int.* 2005, 154, 181-194.
5. Roostalu U., Kutuev I., Loogväli E. L., Metspalu E., Tambets K., Reidla M., Khusnutdinova E. K., Usanga E., Kivisild T., Villems R.: Origin and expansion of haplogroup H, the dominant human mitochondrial DNA lineage in West Eurasia: the Near Eastern and Caucasian perspective. *Mol. Biol. Evol.* 2007, 24, 436-448.
6. Grzybowski T., Malyarchuk B. A., Derenko M. V., Perkova M. A., Bednarek J., Woźniak M.: Complex interactions of the Eastern and Western Slavic populations with other European groups as revealed by mitochondrial DNA analysis. *Forensic Sci. Int. Genetics* 2007, 1, 141-147.
7. Malyarchuk B., Grzybowski T., Derenko M., Perkova M., Vanecek T., Lazur J., Gomolcak P., Tsybovsky I.: Mitochondrial DNA phylogeny in Eastern and Western Slavs. *Mol. Biol. Evol.* 2008, 25, 1651-1658.
8. van Oven M., Kayser M.: Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum. Mutat.* 2008, DOI: 10.1002/humu. 20921.
9. Kwok P. Y.: Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2001, 2, 235-258.
10. Quintáns B., Alvarez-Iglesias V., Salas A., Phillips C., Lareu M. V., Carracedo A.: Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. *Forensic Sci. Int.* 2004, 140, 251-257.
11. Parson W., Fendt L., Ballard D., Børsting C., Brinkmann B., Carracedo A., Carvalho M., Coble M. D., Real F. C., Desmyter S., Dupuy B. M., Harrison C., Hohoff C., Just R., Krämer T., Morling N., Salas A., Schmitter H., Schneider P. M., Sonntag M. L., Vallone P. M., Brandstätter A.: Identification of West Eurasian mitochondrial haplogroups by mtDNA SNP screening: Results of the 2006-2007 EDNAP collaborative exercise. *Forensic Sci. Int. Genetics* 2008, 2, 61-68.
12. Brandstätter A., Parsons T. J., Parson W.: Rapid screening of mtDNA coding region SNPs for the identification of west European Caucasian haplogroups. *Int. J. Legal Med.* 2003, 117, 291-298.
13. Mikkelsen M., Rockenbauer E., Sørensen E., Børsting C., Morcing N.: A mitochondrial DNA SNP multiplex assigning Caucasians into 36 haplo- and subhaplogroups. *Forensic Sci. Int. Genetics* 2008, 1, 287-289.
14. Brandstätter A., Zimmermann B., Wagner J., Göbel T., Röck A., Salas A., Carracedo A., Parson W.: Timing and deciphering mitochondrial DNA macro-haplogroup R0 variability in Central Europe and Middle East. *BMC Evol. Biol.* 2008, 8, 191.
15. Brandstätter A., Salas A., Niederstätter H., Gassner C., Carracedo A., Parson W.: Dissection of mitochondrial superhaplogroup H using coding region SNPs. *Electrophoresis* 2006, 27, 2541-2550.
16. Malyarchuk B. A., Grzybowski T., Derenko M. V., Czarny J., Woźniak M., Miścicka-Śliwka D.: Mitochondrial DNA variability in Poles and Russians. *Ann. Hum. Genet.* 2002, 66, 261-283.
17. Alvarez-Iglesias V., Jaime J. C., Carracedo A., Salas A.: Coding region mitochondrial DNA SNPs: Targeting East Asian and Native American haplogroups. *Forensic Sci. Int. Genetics* 2007, 1, 44-55.
18. Kong Q. P., Bandelt H. J., Sun C., Yao Y. G., Salas A., Achilli A., Wang C. Y., Zhong L., Zhu C. L., Wu S. F., Torroni A., Zhang Y. P.: Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations. *Hum. Mol. Genet.* 2006, 15, 2076-2086.
19. Derenko M., Malyarchuk B., Grzybowski T., Denisova G., Dambueva I., Perkova M., Dorzhu C., Luzina F., Lee H. K., Vanecek T., Villems R., Zakharov I.: Phylogeographic analysis of mitochondrial DNA in northern Asian populations. *Am. J. Hum. Genet.* 2007, 81, 1025-1041.
20. Tamm E., Kivisild T., Reidla M., Metspalu M., Smith D. G., Mulligan C. J., Bravi C. M., Rickards O., Martinez-Labarga C., Khusnutdinova E. K., Fedorova S. A., Golubenko M. V., Stepanov V. A., Gubina M. A., Zhadanov S. I.,

Ossipova L. P., Damba L., Voevoda M. I., Dipierri J. E., Villems R., Malhi R. S.: Beringian standstill and spread of Native American founders. *PLoS ONE* 2007, 2: e829.

21. Achilli A., Perego U. A., Bravi C. M., Coble M. D., Kong Q. P., Woodward S. R., Salas A., Torroni A., Bandelt H. J.: The phylogeny of the four pan-American MtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies. *PLoS ONE* 2008, 3: e1764.

22. Behar D. M., Villems R., Soodyall H., Blue-Smith J., Pereira L., Metspalu E., Scozzari R., Makkan H., Tzur S., Comas D., Bertranpetit J.,

Quintana-Murci L., Tyler-Smith C., Wells R. S., Rosset S.: The dawn of human matrilineal diversity. *Am. J. Hum. Genet.* 2008, 82, 1130-1140.

Adres do korespondencji:

Dr hab. Tomasz Grzybowski

Katedra Medycyny Sądowej

Zakład Genetyki Molekularnej i Sądowej UMK

w Toruniu Collegium Medicum w Bydgoszczy

ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9

85-094 Bydgoszcz

Tel: +48 52 585 3556

e-mail: tgrzyb@cm.umk.pl