



WYKORZYSTANIE MITOCHONDRIALNEGO DNA W KRYMINALISTYCE I MEDYCYNIE SĄDOWEJ

Od czasów Karla Landstainera i odkrycia polimorfizmu układu grupowego krwi ABO, upłynęło ponad 100 lat. W tym czasie postęp wiedzy w obszarze biologii molekularnej przyczynił się do poszerzenia możliwości genetycznej identyfikacji człowieka. Obecnie eksperci pracujący w Laboratoriach Medycyny Sądowej posługują się na co dzień metodami opartymi o najnowsze technologie, umożliwiające skuteczne zamykanie nierozwiązanych dotąd spraw kryminalistycznych z sprzed kilkudziesięciu lat. Należy do nich między innymi analiza mitochondrialnego DNA (mtDNA), która doskonale uzupełnia klasyczne już badania mniej trwałego, jądrowego DNA (nDNA), na podstawie którego oznacza się *wysoko-rozdzielcze* profile w układach STR (ang. *Short Tandem Repeats*). Z wielu zniszczonych mikrośladów biologicznych, których badanie z wykorzystaniem klasycznych metod analizy układów STR jest już niemożliwe, udaje się wyizolować i oznaczyć profil mtDNA, co umożliwia przeprowadzenie skutecznej identyfikacji genetycznej i wskazanie rzeczywistych sprawców przestępstw.

Czym jest mitochondrialny DNA

Całość informacji o ludzkim organizmie kodowana jest przez dwa rodzaje DNA: a) jądrowe, przechowywane w formie chromosomów w jądrze komórkowym, dziedziczone w połowie od ojca i w połowie od matki, oraz b) mitochondrialne, koliste DNA o długości ok. 16569 par zasad, przechowywane w licznych mitochondriach komórki i przekazywane dziecku wyłącznie przez matkę^{1,2}. Sekwencja mtDNA zawiera informację o 37 genach jak również rejony niekodujące, w tym wysoce zmienne sekwencje HVI, HVII i HVIII, wykorzystywane w identyfikacji genetycznej dla celów sądowych. W przeciwieństwie do jądrowego DNA, obejmującego dwie kopie nDNA, mtDNA w pojedynczej komórce występuje w znacznej ilości (do 10000 kopii)^{3,4}. Ze względu na kolistą charakter cząsteczki mtDNA cechuje także znacznie wyższa trwałość, co umożliwia porównanie profili próbek o niskiej jakości np. pobranych ze zwłok.

Ciekawostka: Jak zidentyfikowano Romanowów?

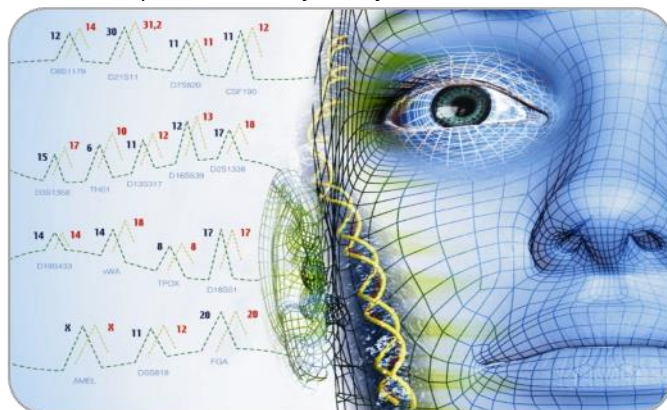
Dynastia Romanowów sprawowała władzę w carskiej Rosji przez ponad 300 lat. W roku 1917, w trakcie rewolucji bolszewickiej car Mikołaj został rozstrzelany, podobnie jak członkowie jego najbliższej rodziny, na terenie Syberii. Przez kolejne lata władze komunistyczne Rosji uniemożliwiały odnalezienie miejsca pochówku rodziny carskiej. Ponadto, utrzymywano, że ciała wszystkich ofiar egzekucji zostały spalone. Uzyskanie nowych informacji stało się możliwe dopiero w latach 90-tych XX wieku, m.in. dzięki analizie mitochondrialnego DNA⁷.

Cząsteczki te wykorzystywane są do ustalania pokrewieństwa w linii matka – potomstwo jak również określania pokrewieństwa między rodzeństwem, dla którego ustalenie wspólnej, niezjącej matki może być przeprowadzone wyłącznie metodą analizy mtDNA^{3,5}.

W badaniach wykorzystuje się zarówno sekwencje konserwatywne ewolucyjnie (niezmienne na przestrzeni setek pokoleń) jak również miejsca DNA, które mogą ulec zmianie nawet w ciągu jednego pokolenia, dzięki czemu możliwym jest stworzenie mapy genealogicznej pokrewieństwa zarówno między badanymi osobami jak również grupami etnicznymi i całymi populacjami, ustalając pochodzenie badanej osoby aż od czasów powstania człowieka, najprawdopodobniej we Wschodniej Afryce^{9,10}, gdzie 100 - 200 tys. lat temu żyła pierwsza kobieta, umownie nazwana *mitochondrialną Ewą*.

Kim byli nasi przodkowie

Jak wykazały najnowsze badania, współcześni Europejczycy wywodzą się zaledwie od siedmiu kobiet – „córek Ewy”, żyjących ok. 55 - 10 tysięcy lat temu i oznaczonych w j. ang. imionami: Ursula (55 tys.), Jasmine (45 tys.), Xenia (30 tys.), Helena (30 tys.), Katrine (12 tys.), Velda (12 tys.) oraz Tara (10 tys.)¹¹. Pierwsze litery tych imion wyznaczają nazwy 7 głównych haplogrup mtDNA (np. K1a). Najstarsza z haplogrup – U5 wykształciła się na długo przed rozwinięciem rolnictwa (10 tys. lat p.n.e.), które uznaje się za jeden z największych skoków cywilizacyjnych ludzkości. Większość współczesnych Polaków to potomkowie tylko jednej z wymienionych kobiet – Katrine, którzy stanowią 10% żyjących dziś Europejczyków. Dla haplogrupy K charakterystyczne są zmiany w mtDNA (SNP) oznaczone jako T16224C oraz T16311C¹¹. W średniowieczu, na terenie Polski pojawiły się zmiany SNP, które najbardziej przypominają te obserwowane dziś u Norwegów (16%), Litwinów (53%) i Rosjan (13%). W kolejnych wiekach pojawiały się zmiany pochodzące z różnych grup etnicznych napływających do Polski narodów. Jesteśmy zatem potomkami wielu narodów, które żyły na ziemiach polskich w całej naszej historii.



W trakcie śledztwa, gdy wszczęto oficjalne dochodzenie w 1991 w sprawie dynastii Romanowów, dokonano ekshumacji domniemanych szczątków rodziny carskiej. Ze 100 kostnych szczątków zrekonstruowano dziewięć szkieletów, w tym pięć kobiecych i cztery męskie. W celu ostatecznego rozstrzygnięcia, czy odnalezione szczątki należą do członków rodu Romanowów, przeprowadzono testy genetyczne polegające na porównaniu haplotypu mtDNA. Fragmenty kostne domniemanej carycy Aleksandry oraz należące do jej trzech domniemanych córek, posiadały identyczny haplotyp mtDNA, który następnie porównano z próbką otrzymaną od księcia Edynburga (żyjącego współcześnie krewnego w linii matki). Tożsamość cara Mikołaja udało się potwierdzić po przeanalizowaniu mtDNA jego współcześnie żyjących dalekich krewnych - Xenii Sfirmi oraz księżnej Fife, jak również na podstawie ekshumacji i analizy kości brata cara Mikołaja, wielkiego księcia Georgija. Badania te wskazują, że wyniki sekwencjonowania mtDNA stanowią wiarygodny dowód nie tylko w kryminalistyce, ale także w badaniach

Wgląd w przeszłość genetyczną naszych przodków

Nowe metody badań DNA rozwijającej się genealogii genetycznej dają możliwość wglądu w przeszłość genetyczną i ustalenia korzeni genealogicznych. Współczesne metody biologii molekularnej istotnie ułatwiają weryfikację więzi rodzinnych, dziedziczonych nazwisk, określanie pochodzenia grup przodków, gałęzi rodów oraz szlaków migracji na przestrzeni tysięcy lat wstecz. Informacje te jako ostateczne i rozstrzygające doskonale uzupełnią wyniki badań klasycznej genealogii, skracając czas poszukiwań i wskazują na nowe źródła udokumentowanej informacji^{7,10}.

W genetycznych badaniach genealogicznych, obok analizy mtDNA (w linii matki), wykorzystuje się także jądrowe **DNA chromosomu Y**, dziedziczonego wyłącznie w linii męskiej i umożliwiającego np. ustalenie korzeni nazwiska⁹. Szacuje się, że pierwszy człowiek umownie nazywany Adamem, który dał początek męskiej linii chromosomu Y żył ok. 200 – 300 tys. lat p.n.e.

Wynikiem badania chromosomu Y jest profil genetyczny, przedstawiony jako zestaw numerycznie oznaczonych alleli układów STR chromosomu płci męskiej. Profil ten, jako liczbowy zestaw danych (alleli) wprowadzany jest następnie do bioinformatycznych baz, które zawierają tysiące profili osób wcześniej przebadanych. Analiza polega na porównaniu profilu badanej osoby z profilami osób w Polsce i na świecie, a tym samym określenie jej pochodzenia w linii męskiej^{9,12}. Większość współczesnych mężczyzn - Słowian charakteryzuje haplogrupa R1a1, którą znaleźć można u 63% Serbołużyczan, 55% Polaków, 50% Białorusinów, 46% Rosjan 45% Litwinów, 43% Ukraińców, 40% Łotyszów, jak również u narodów ugrofińskich - 33% Estończyków i 25% Węgrów⁹.

Zarówno chromosom Y jak i mtDNA na przestrzeni wieków zmieniały się (mutowały): a) wystarczająco powoli by zachować cechy charakterystyczne dla poszczególnych grup populacji odseparowanych od siebie przestrzennie przez kontynenty języki i zwyczaje, ale jednocześnie, b) wystarczająco szybko by móc ustalić pokrewieństwo współczesne między poszczególnymi osobami.

W przeciwieństwie do chromosomu Y, mitochondrialne DNA dziedziczone jest z pokolenia na pokolenie w linii żeńskiej (syn dziedziczy mtDNA matki ale nie przekazuje go dalej swoim potomkom)^{10,12}. Analiza polega na ustaleniu różnic między sekwencją mtDNA badanej osoby a sekwencją referencyjną rCRS (revised Cambridge Reference Sequence, NCBI Ac. No.: J01415.2), co umożliwia ustalenie profilu mtDNA, składającego się z alleli typu SNP (*ang. Single Nucleotide Polymorphism*).

Pewne zmiany w sekwencji mtDNA mogą zwiększać predyspozycje do chorób genetycznie uwarunkowanych¹³.

W genealogii, profil mtDNA wprowadzany jest do baz zawierających dane wcześniej przebadanych osób, a następnie określany jest stan pochodzenia badanej osoby w linii żeńskiej. Ostateczny wynik badania prezentowany jest graficznie i może obejmować między innymi schemat - mapkę pochodzenia^{10,13}.

mtDNA w badaniach kryminalistycznych

Na łamach czasopisma *Problemy Kryminalistyki*, przedstawiono artykuł pod tytułem *Zastosowanie analizy mitochondrialnego DNA w badaniach kryminalistycznych – perspektywy*, gdzie autorzy wskazują na znaczny potencjał mitochondrialnego DNA w kontekście przeprowadzanych procesów śledczych⁸. W badaniach tych, analiza mtDNA znajduje zastosowanie, zarówno w ujawnianiu sprawców przestępstw współczesnych, jak i w sprawach z przed wielu lat, dotyczących m.in. identyfikacji osób zaginionych. W przytoczonym artykule opisano zasady postępowania z badanym materiałem, użyteczne również dla osób zajmujących się bezpośrednim zabezpieczaniem biologicznych na miejscu zdarzenia. Publikacja podsumowuje także podstawowe wytyczne pracy laboratoryjnej z materiałem dowodowym i analizą sekwencyjną, tak by doprowadzić do wiarygodnych, niepodważalnych wniosków z badań^{4,8}.

Nowe zastosowania analizy mtDNA w badaniach kryminalistycznych opisywane są szeroko na łamach czasopisma [Forensic Science International](http://www.forensic-science-international.com). Elektroniczna baza informacji technologicznej dotyczącej badań mtDNA dostępne są także pod adresem: badanieojcostwa.pl/biblioteka.html

Nowe skuteczniejsze metody badań mtDNA

Większość laboratoriów, w badaniach mtDNA wykorzystuje znaną od lat, choć czasochłonną i kosztowną metodę - sekwencjonowania *Sanger*. Rutynowa praca z mtDNA oraz wieloletnie doświadczenie zespołu DNAi, umożliwiły jednak implementację innowacyjnego testu, który ma na celu niezwykle prostą technicznie identyfikację wyłącznie różnicujących miejsc SNP mtDNA (mtDNA_{test}-SNP). Test ten został oparty o znaną w większości laboratoriów technikę rozdziału fluorescencyjnych fragmentów DNA,



których analiza nie różni się istotnie od metod badań układów STR. Użycie modułu SNP zestawu mtDNAtest pozwala na uzyskanie wstępnych i wiarygodnych wyników z wielu miejsc SNP jednocześnie. Specjalnie dobrany zestaw identyfikuje jedną z czterech zasad DNA (A, G, T lub C) w każdym z miejsc SNP wysoce-zmiennych regionów mtDNA, znajdując zastosowanie w identyfikacji genetycznej oraz w porównawczej analizie mtDNA próbek śladów biologicznych. Takie wstępne typowanie istotnych z punktu widzenia dowodowego i procesowego prób ogranicza ich liczbę umożliwiając skupienie się biegłych wyłącznie na próbach ważnych, co znacznie skraca czas badań i obniża koszt bardziej wymagających analiz sekwencyjnych (moduł: mtDNAtest-SEK).

zakres analizy mtDNA [bp]	Pozycja SNP na mtDNA*	B50026345 Probka porównawcza AM		B50023843 Probka badana fragment kości	
		Mitotyp dominujący	Heteroplazma variant mieszaninowy	Mitotyp dominujący	Heteroplazm & variant mieszaninowy
HVI: 1-314	72	bz	-	T72C	-
	73	A73G	A73	bz	-
	185	G185A	-	bz	-
	263	A263G	-	A263G	-
	295	C295T	-	bz	-
	309.1	-309.1C	-	-309.1C	-309.1T
HVI: 16012-16569	A508G	A508G	-	bz	-
	G15928A	G15928A	-	G15928A	-
	16069	C16069T	-	bz	-
	16126	T16126C	-	bz	-
	G16145A	G16145A	-	bz	-
	16213	bz	-	G16213A	-
	16298	bz	-	T16298C	-

Sekwencja referencyjna rCRS (revised Cambridge Reference Sequence ac nr: J01415.2 NCBI)
*brak zmian względem sekwencji referencyjnej

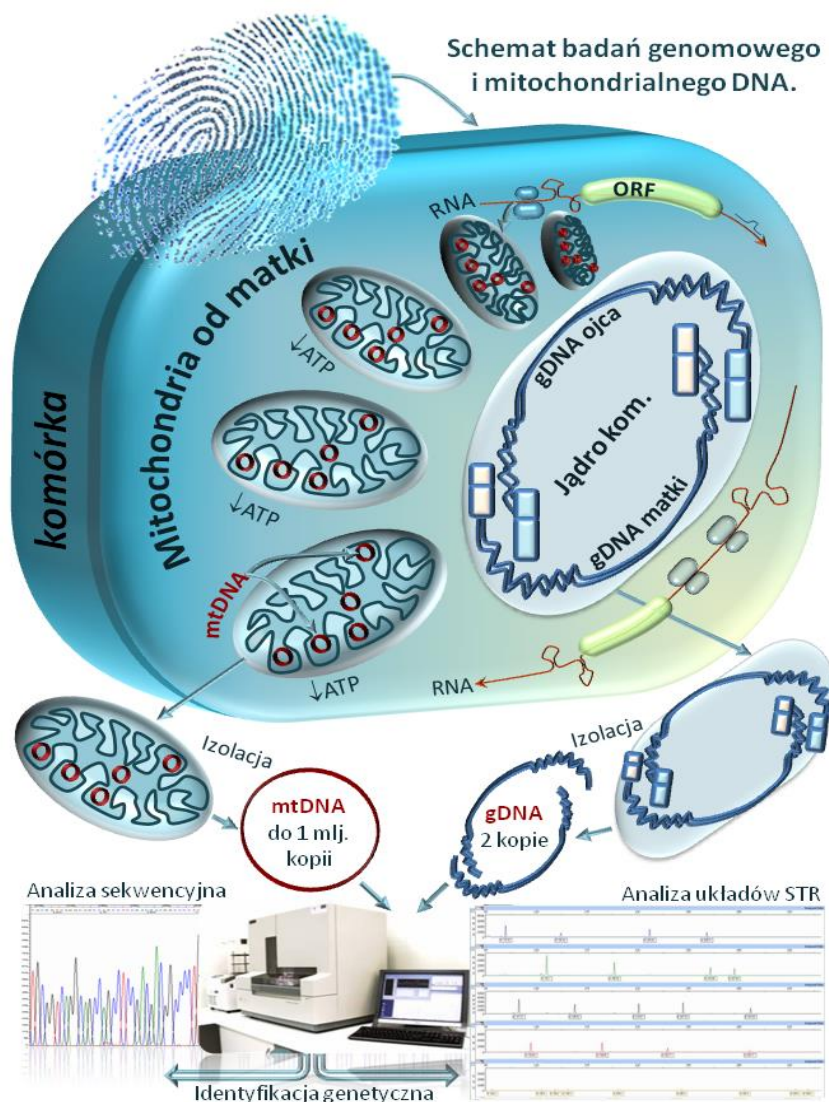
Prócz wymienionego powyżej testu mtDNAtest-SNP, dostępne są również standardowe zestawy do amplifikacji zmiennych rejonów mitochondrialnego DNA (HVI, HVII, HVIII), sekwencjonowanych następnie za pomocą specjalnie dobranego zestawu oligonukleotydów, umożliwiających otrzymanie sekwencji nukleotydów badanego fragmentu mtDNA (np. mtdnatest.com). Uzyskaną sekwencję można następnie przeanalizować w prostym, dedykowanym programie, który wyrzuca gotową tabelę alleli mtDNA. Wysoka czułość obydwu przedstawionych modułów, przy zastosowaniu szeregu kontroli i systemów uniemożliwiających powstawanie wyników fałszywie negatywnych i fałszywie pozytywnych, zapewniają jednoznaczność i pewność prowadzonych badań^{4,5}. Analiza mtDNA z wykorzystaniem technologii mtDNAtest nie wymaga żadnych specjalnych przystosowań laboratorium i może być prowadzona w każdej pracowni genetycznej, rutynowo prowadzącej analizy układów STR jądrowego DNA, z dostępem do termocyklera i sekwenatora. Moduły mtDNAtest-SNP i mtDNAtest-seq zestawu mtDNAtest pracują z wykorzystaniem różnych metod podstawowych tj. minisekwencjonowania (podobnego do analizy fragmentów) lub klasycznego sekwencjonowania i w zależności od potrzeb biegłego sądowego mogą być stosowane niezależnie lub uzupełniać się nawzajem. Opracowane technologie potwierdziły swoją **wiarygodność** w wykonanych międzynarodowych testach biegłości w badaniach mitochondrialnego DNA – GEDNAP mtDNA (ang. *German DNA Profiling Group*). Instytucja przeprowadzająca testy GEDNAP uważana jest za światowe centrum naukowo-badawcze, które wyznacza normy jakości i standardy badań genetycznych w medycynie sądowej i kryminalistyce.



- Badania genetyczne • mitochondrialne DNA (mtDNA)
- jądrowe DNA (testy STR) • daktyloskopia • Testy narkotykowe
- Genealogia • mtDNA zwierząt • Identyfikacja genetyczna roślin
- Kompleksowe ekspertyzy kryminalistyczne • Certyfikaty GEDNAP

Potwierdzeniem profesjonalizmu i jakości prowadzonych badań są uzyskane przez laboratorium DNAi międzynarodowe certyfikaty GEDNAP. Specjaliści zespołu wraz z **biegłym** sądowym przy Sądzie Okręgowym w Krakowie, Warszawie i Katowicach, wykazali się bezbłędnym wykonaniem najnowszych testów GEDNAP, które obejmowały m.in. ustalenie profili jądrowego DNA na podstawie autosomalnych układów STR, rekomendowanych przez Europejską Sieć Instytutów Kryminalistycznych ENFSI, EDNAP, NIST, jak również program CODIS, który wspiera FBI. Laboratorium DNAi uzyskało także certyfikat GEDNAP w zakresie identyfikacji biochemicznej krwi, nasienia i śliny. Powyższe certyfikaty gwarantują najwyższą jakość wykonywanych badań, wiarygodność oraz pewność uzyskiwanych wyników. Więcej informacji na stronach internetowych www.dnai.pl, www.ekspertyzykryminalistyczne.com.pl

Mitochondria, zajmują przestrzeń cytoplazmatyczną wewnątrz komórki i pełnią funkcje „pieca” dostarczającego komórce potrzebnej energii w postaci ATP. W pojedynczej ludzkiej komórce somatycznej znajduje się od kilku do kilku tysięcy mitochondriów (zwykle ok. 1000), z których każdy zawiera od 4 do 10 kopii mtDNA, co obrazuje ilościową przewagę mitochondrialnego DNA nad jego genomowym odpowiednikiem^{4,6}. Szansa zachowania nienaruszonej kopii mitochondrialnego DNA w zdegradowanym materiale jest wielokrotnie wyższa, co tłumaczy znaczenie przewagi mtDNA nad nDNA. Z technologicznego punktu widzenia, dla skutecznej analizy porównawczej badanego materiału, istotna jest również integralność wyjściowego DNA. Niezabezpieczone, wolne końce nDNA zwiększają prawdopodobieństwo jego enzymatycznej degradacji (np. w wyniku aktywności egzonukleaz mikroorganizmów), podczas gdy koliste, zamknięte cząsteczki mtDNA nie dysponują wolnymi końcami, co determinuje ich **zwiększoną trwałość** w niesprzyjających warunkach środowiskowych. Powyższe cechy sprawiają, że pomimo mniejszej zmienności populacyjnej i zdolności różnicującej, mtDNA wykorzystywany jest do identyfikacji genetycznej materiałów, zawierających śladowe ilości DNA. Technologia badań mtDNA stosuje się w analizie szczątków ludzkich (np. kości), mikrośladów w postaci zachowanej odzieży, niedopałków papierosów i wielu innych śladów biologicznych, dla których przeprowadzenie klasycznej analizy jądrowej medycyny sądowej zależy bezpośrednio od zdolności laboratorium do zastosowania metod alternatywnych względem klasycznej analizy STR nDNA, w tym sekwencjonowanie mtDNA^{3,6}.



Literatura:

- ¹ Wójcikiewicz J (red.). *Ekspertyza sądowa. Zagadnienia wybrane*, Oficyna Wolters Kluwer, Warszawa 2007.
- ² Salas A, Bandelt HJ, Macaulay V, Richards MB. Phylogeographic investigations: the role of trees in forensic genetics. *Forensic Sci Int.* 2007 May 3;168(1):1-13.
- ³ Andréasson H, Nilsson M, Budowle B, Lundberg H, Allen M. Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials. *Forensic Sci Int.* 2006 Dec 1;164(1):56-64.
- ⁴ Yao YG, Bravi CM, Bandelt HJ. A call for mtDNA data quality control in forensic science. *Forensic Sci Int.* 2004 Apr 20;141(1):1-6.
- ⁵ Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int.* 2007 Jan 17;165(2-3):216-24. Epub 2006 Jun 16.
- ⁶ Alonso A, Martín P, Albarrán C, García P, García O, de Simón LF, García-Hirschfeld J, Sancho M, de La Rúa C, Fernández-Piqueras J. Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Sci Int.* 2004 Jan 28;139(2-3):141-9.
- ⁷ Ivanov PL, Wadhams MJ, Roby RK, Holland MM, Weedn VW, Parsons TJ. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat Genet.* 1996 Apr;12(4):417-20.
- ⁸ Gawęda-Walerych K, Sołyszewski I, Zastosowanie analizy mitochondrialnego DNA w badaniach kryminalistycznych – perspektywy. *Problemy kryminalistyki.* Warszawa 2005, nr 248/05.
- ⁹ Walsh B. Estimating the time to the most recent common ancestor for the Y chromosome or mitochondrial DNA for a pair of individuals. *Genetics.* 2001 Jun;158(2):897-912.
- ¹⁰ Tetushkin Ela. [Genetic genealogy: history and methodology]. *Genetika.* 2011 May;47(5):581-96.
- Sykes Bryan. *The Seven Daughters of Eve.* W.W.Norton & Company Inc. (320 pages). ISBN 978-0-393-02018-2 (July 2001). Retrieved 4 February 2015.
- ¹² Tofanelli S, Taglioli L, Bertocini S, Francalacci P, Klyosov A, Pagani L. Mitochondrial and Y chromosome haplotype motifs as diagnostic markers of Jewish ancestry: a reconsideration. *Front Genet.* 2014 Nov 10;5:384.
- ¹³ Otten AB, Smeets HJ. Evolutionary defined role of the mitochondrial DNA in fertility, disease and ageing. *Hum Reprod Update.* 2015 May 14. pii: dmv024.