

## WYKORZYSTANIE BADAŃ 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 kilkadziesiąt lat. Należy do nich między innymi analiza mitochondrialnego DNA (mtDNA), która doskonale uzupełnia klasyczne już badania mniej trwałego, genomowego DNA (gDNA). Wiedza na temat możliwości badań z wykorzystaniem tego DNA ułatwia podejmowanie właściwych decyzji umożliwiających przeprowadzenie skutecznej identyfikacji i skazania rzeczywistych sprawców przestępstw, stąd propozycja niniejszego artykułu.

### Czym jest mitochondrialny DNA?

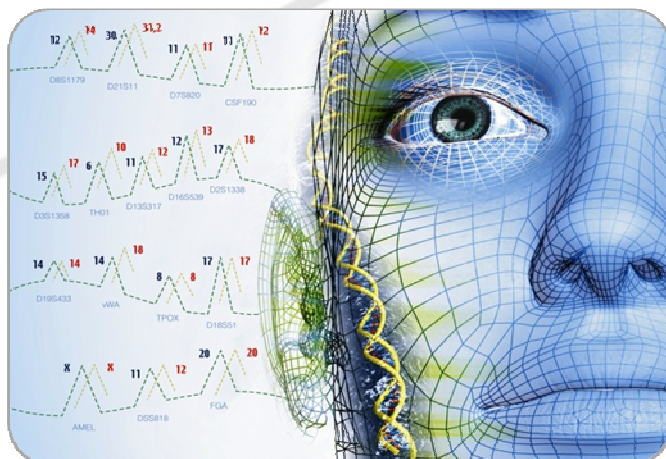
Całość informacji o ludzkim organizmie kodowana jest przez dwa rodzaje DNA, a) genomowe (gDNA), przechowywane w formie chromosomów w jądrze komórkowym, dziedziczone w połowie od ojca i matki, jak również b) mitochondrialne, koliste DNA (mtDNA) o długości 16569 par zasad, przechowywane w licznych mitochondriach komórki i dziedziczone wyłącznie od matki. Sekwencja mtDNA zawiera zarówno informację o 37 genach jak również rejony niekodujące, w tym wysoce zmienne sekwencje HVI i HVII, wykorzystywane w identyfikacji genetycznej dla celów sądowych. Duża liczba cząsteczek mtDNA przypadających na pojedynczą komórkę, które charakteryzuje znacznie wyższa trwałość względem gDNA umożliwia przeprowadzenie analizy porównawczej próbek nawet bardzo rozłożonych fragmentów zwłok, ustalenie pokrewieństwa w linii matka –

potomstwo jak również określenie pokrewieństwa między rodzeństwem, dla którego ustalenie wspólnej, nieżyjącej matki może być ocenione wyłącznie metodą analizy porównawczej mtDNA.

Mitochondria, zajmują przestrzeń cytoplazmatyczną wewnątrz komórki i pełnią funkcje „pieca” dostarczającego komórce potrzebnej energii w postaci ATP. W pojedynczej ludzkiej komórce somatycznej (zawierającej jedynie po dwie kopie chromosomów, od matki i ojca) 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. Z technologicznego punktu widzenia, dla prawidłowej amplifikacji PCR badanego materiału, istotna jest trwałość oraz integralność DNA. Sama ilość wyjściowych kopii mtDNA ma nie większy wpływ na PCR niż ilość kopii gDNA w analizie układów STR (reakcje PCR mają określony zakres tolerancji ilości DNA, niezależnie od jego rodzaju). Szansa jednak zachowania nienaruszonej kopii mtDNA w zdegradowanym materiale jest wielokrotnie wyższa, co tłumaczy znaczenie przewagi ilościowej mtDNA nad gDNA. Ze względu na powyższe cechy oraz **wysoką trwałość**, wynikającą z zamkniętego, kolistego charakteru cząsteczki, mitochondrialny DNA wykorzystywany jest w identyfikacji genetycznej i analizie porównawczej, zwłaszcza gdy badany materiał biologiczny jest mocno zdegradowany lub jego ilość jest śladowa. Technologią 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 genomowego DNA jest niemożliwe. W takich przypadkach skuteczność biegłego medycyny sądowej zależy bezpośrednio od zdolności laboratorium do zastosowania metod alternatywnych względem klasycznej analizy STR często zdegradowanego genomowego DNA.

### Ciekawostka: Czy jesteś Romanowem?

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 spalane. Uzyskanie nowych informacji stało się możliwe dopiero w 1991 roku,



gdy wszczęto oficjalne dochodzenie. W trakcie śledztwa 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 w porównaniu z próbką otrzymana od księcia Edynburga (żyjącego współcześnie krewnego w linii matczynej). Tożsamość cara Mikołaja udało się potwierdzić po przeanalizowaniu mtDNA pochodzącym od Xenii Sfiri oraz księżnej Fife (współcześnie żyjącej dalekie krewne w linii matczynej) oraz po ekshumacji i analizie kości brata cara Mikołaja, wielkiego księcia Georgija. Wyniki badań genetycznych stanowią wiarygodny dowód nie tylko w dochodzeniach prowadzonych przez prokuratury, ale również w badaniach antropologicznych.

### Wgląd w przeszłość genetyczną naszych przodków.

Nowe metody badań DNA rozwijającej się genealogii genetycznej dają możliwość wglądu w przeszłość genetyczną i ustalenia korzeni genealogicznych. Możliwości jakie dają współczesne metody biologii molekularnej umożliwiają weryfikację: więzi rodzinnych, dziedziczonych nazwisk, określenie 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, skracają czas poszukiwań i wskazują na nowe źródła udokumentowanej informacji.

W genetycznych badaniach genealogicznych wykorzystuje się dwa typy DNA: genomowe DNA (gDNA) chromosomu Y, dziedziczonego wyłącznie w linii męskiej, umożliwiającego np. ustalenie korzeni nazwiska. Wynikiem badania jest PROFIL GENETYCZNY CHROMOSOMU Y, przedstawiony jako zestaw numerycznie oznaczonych alleli układów STR chromosomu Y, które jako liczbowy zestaw danych wprowadzane są następnie do bioinformatycznych baz danych zawierających tysiące profili genetycznych chromosomu Y wcześniej przebadanych osób. Analiza ma na celu porównanie profilu badanej osoby z profilami osób w Polsce i na całym świecie, a tym samym określenie jej pochodzenia w linii męskiej.

Mitochondrialne DNA (mtDNA), dziedziczone jest z pokolenia na pokolenie w linii żeńskiej (syn dziedziczy mtDNA matki ale nie przekazuje go dalej swoim potomkom). Wynikiem badania staje się PROFIL GENETYCZNY mtDNA, przedstawiony jako zestaw numerycznie oznaczonych alleli miejsc SNP mitochondrialnego DNA, które jako profil wprowadzane są następnie do baz zawierających profile wcześniej przebadanych osób. Analiza ma na celu porównanie profilu badanej osoby z profilami osób w Polsce i na całym świecie, a tym samym określenie jej pochodzenia w linii żeńskiej.

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 badaniach wykorzystuje się zatem 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 we Wschodniej Afryce.

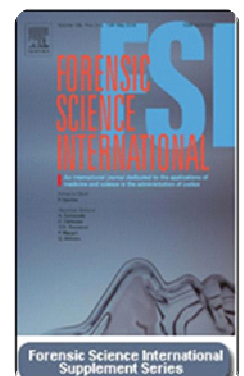
Ostateczny wynik badania prezentowany jest graficznie i obejmuje między innymi schemat - mapkę pochodzenia.

### mtDNA w badaniach kryminalistycznych.

Na łamach czasopisma „Problemy kryminalistyki”, Wydawnictwa Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego KGP w Warszawie przedstawiono ciekawy artykuł przeglądowy na temat znaczenia mtDNA w Medycynie Sądowej. W publikacji pt.: „[Zastosowanie analizy mitochondrialnego DNA w badaniach kryminalistycznych – perspektywy](#)”, autorzy wskazują na ogromny potencjał mtDNA w kontekście przeprowadzanych procesów śledczych. Analiza mitochondrialnego DNA znajduje zastosowanie, zarówno we współcześnie ujawnionych przestępstwach, jak również sprawach z przed wielu lat dotyczących między innymi identyfikacji zaginionych osób. W cytowanym artykule opisano zasady postępowania z badanym materiałem, użyteczne również dla osób zajmujących się bezpośrednim zabezpieczaniem śladów na miejscu zdarzenia. Autorzy publikacji podsumowują podstawowe zasady pracy laboratoryjnej z materiałem dowodowym i analizą sekwencyjną, tak by zapobiec uzyskaniu wyników zarówno fałszywie pozytywnych jak też fałszywie negatywnych i uzyskać wiarygodne, niepodważalne wyniki badań. Więcej ciekawych publikacji obejmujących tematykę badań mitochondrialnego DNA w kontekście badań kryminalistycznych znajdą Państwo między innymi w [Forensic Science International](#) ([www.fsijournal.org](http://www.fsijournal.org)).

Zapraszamy również do biblioteki popularno-naukowej:

[www.badanieoicostwa.pl/biblioteka.html](http://www.badanieoicostwa.pl/biblioteka.html)



**Nowe skuteczniejsze metody badań mtDNA.**

Rutynowa praca z mitochondrialnym DNA oraz wieloletnie doświadczenie Zespołu ds. Ekspertyz Kryminalistycznych Pracowni Badań Ojcostwa, Pokrewieństwa oraz identyfikacji genetycznej BioTe21, pozwoliły na opracowanie nowego skuteczniejszego testu, który umożliwia niezwykle prostą technicznie identyfikację najbardziej różnicujących na mtDNA miejsc SNP (ang.: Single Nucleotide Polymorphism) w oparciu o znaną w większości laboratoriów metodę rozdziału fluorescencyjnych fragmentów DNA (moduł: mtDNAtest-SNP). Użycie modułu SNP zestawu mtDNAtest pozwala na uzyskanie wstępnych i wiarygodnych wyników z wielu prób jednocześnie. Takie wstępne wytypowanie istotnych z punktu widzenia dowodowego i procesowego prób ogranicza ich liczbę umożliwiając skupienie się biegłych wyłącznie na próbach ważnych, znacznie skraca czas badań i obniża koszt bardziej zaawansowanych i wykonywanych w dalszej kolejności analiz sekwencyjnych całego obszaru wysoce-zmiennych rejonów HVI i HVII (moduł: mtDNAtest-SEK). Specjalnie dobrany zestaw analizowanych SNP umożliwia badanie najbardziej różnicujących miejsc hiperzmiennych sekwencji HVI i HVII, dzięki czemu znajduje zastosowanie zwłaszcza w identyfikacji genetycznej oraz porównawczej analizie mtDNA próbek śladów biologicznych.

zakres analizy mtDNA [bp]	Pozycja SNP na mtDNA*	H50026345 Próbką porównawczą AM		H50023043 Próbką badaną fragment kości	
		Mitotyp dominujący	Heteroplazma wariant amieszczeniowy	Mitotyp dominujący	Heteroplazma & wariant amieszczeniowy
HVII: 1-314	72	bz	-	T72C	-
	73	A73G	A73	bz	-
	105	G105A	-	bz	-
	263	A263G	-	A263G	-
	295	C295T	-	bz	-
	309.1	-309.1C	-	-309.1C	-309.1T
HVI: 16012-16569	A508G	A508G	-	bz	-
	G15920A	G15920A	-	G15920A	-
	16069	C16069T	-	bz	-
	16126	T16126C	-	bz	-
	G16145A	G16145A	-	bz	-
	16217	bz	-	G16213A	-
	16298	bz	-	T16298C	-

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

Prócz wspomnianego, innowacyjnego na rynku testu analizy wyselekcjonowanych miejsc typu SNP, dostępny jest również standardowy zestaw do amplifikacji zmiennych rejonów mitochondrialnego DNA (HVI i HVII), sekwencjonowanych następnie za pomocą specjalnie dobranego zestawu oligonukleotydów, umożliwiających otrzymywanie za każdym razem dokładnych wyników (moduł: mtDNAtest-SEK).

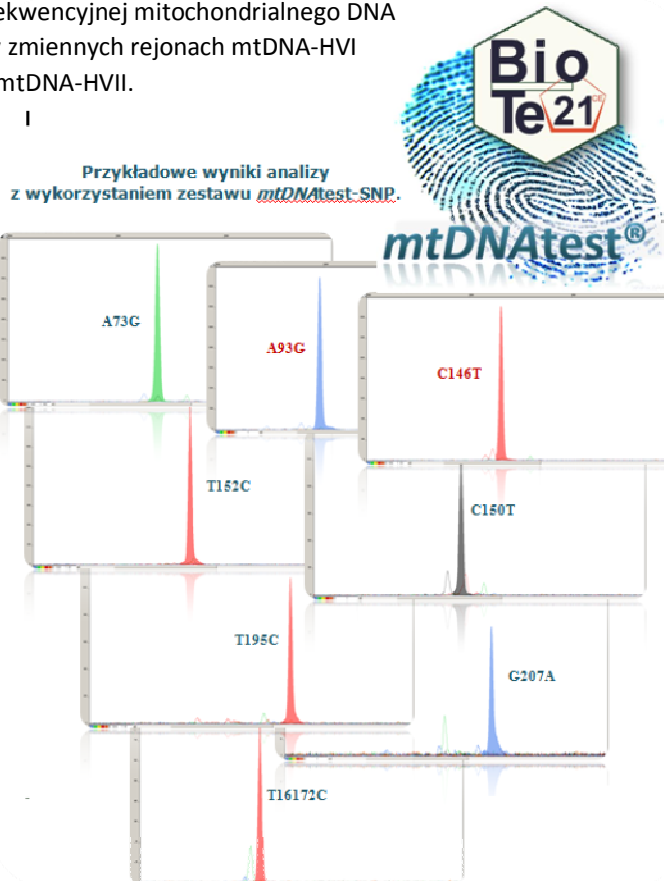
Wysoka czułość obydwu przedstawionych modułów, przy zastosowaniu szeregu kontroli i systemów uniemożliwiających powstawanie wyników fałszywie negatywnych i fałszywie pozytywnych, zapewniają jednoznaczność i pewność prowadzonych badań. Analiza mtDNA z wykorzystaniem technologii mtDNAtest nie wymaga żadnych specjalnych przystosowań laboratorium i może być prowadzona w każdej pracowni genetycznej, rutynowo prowadzącej analizy układów STR (ang.: Short Tandem Repeats) genomowego DNA (gDNA), z dostępem do termocyklera i sekwentatora. Przedstawione powyżej moduły zestawu mtDNAtest pracują z wykorzystaniem różnych metod podstawowych (minisekwencjonowania - analizy

fragmentów lub klasycznego sekwencjonowania) i w zależności od potrzeb biegłego sądowego mogą być stosowane niezależnie lub uzupełniać się nawzajem.



Walidacja: Opracowane technologie potwierdziły swoją wiarygodność w wykonanych przez laboratorium BioTe21 międzynarodowych testach biegłości w badaniach mitochondrialnego DNA – GEDNAP mtDNA (German DNA Profiling Group), które wykonane zostały bezbłędnie.

**Laboratorium BioTe21.** Potwierdzeniem profesjonalizmu i jakości prowadzonych badań są uzyskane przez laboratorium międzynarodowe certyfikaty GEDNAP (German DNA Profiling Group) w zakresie analizy genetycznej DNA 18-stu somatycznych układów typu STR + marker płci (ang.: Short Tandem Repeats), jak również unikalne certyfikaty analizy sekwencyjnej mitochondrialnego DNA w zmiennych rejonach mtDNA-HVI i mtDNA-HVII.



Kolejnym potwierdzeniem jakości prowadzonych przez laboratorium badań jest certyfikat identyfikacji biochemicznej mikrośladów biologicznych (śliny, nasienia, krwi itp.). Powyższe certyfikaty gwarantują najwyższą jakość wykonywanych badań, wiarygodność oraz pewność uzyskiwanych wyników. Testy biegotości w badaniach genetycznych GEDNAP rekomendowane są między innymi przez Europejską Sieć Instytutów Kryminalistycznych (ENFSI). BioTe21 uzyskało również Wpis do Ewidencji Laboratoriów, prowadzonej przez Krajową Radę Diagnostów Laboratoryjnych (KIDL) pod numerem identyfikacyjnym 2782 jak również rejestrację NZOZ BioTe21, wpisanego do rejestru

zakładów opieki zdrowotnej pod numerem księgi 12-01766. Nowe technologie opracowywane są i wykonywane przez specjalistów w zakresie biologii molekularnej i Medycyny sądowej. Laboratorium BioTe21 uzyskało główną nagrodę: 1) "Innowatora Małopolski 2009" 2) „Lidera Ogólnopolskiego Systemu Ochrony Zdrowia” i „Mikroprzedsiębiorcy Roku 2008” (informacje na stronach internetowych). Ekspertyzy wydawane są przez biegłego sądowego w zakresie identyfikacji genetycznej i biochemicznej. Więcej informacji znaleźć państwo mogą na stronach internetowych [www.biote21.com](http://www.biote21.com), [www.ekspertyzykryminalistyczne.pl](http://www.ekspertyzykryminalistyczne.pl)

**Polecana bibliografia:**

Ivanov P.L., Wadhams M.J., Roby R.K., Holland M.M., Wende V.W., Parson T.J., *Mitochondria DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the Remains of Nicholas II*, National Genetics 1996,

Gawęda-Walerych K., Sołyszewski I., *Zastosowanie analizy mitochondrialnego DNA w badaniach kryminalistycznych – perspektywy*, Problemy kryminalistyki 2005,

Wójcikiewicz J. i wsp., *Ekspertyza sądowa. Zagadnienia Wybrane*, Warszawa 2007, s.365-376,

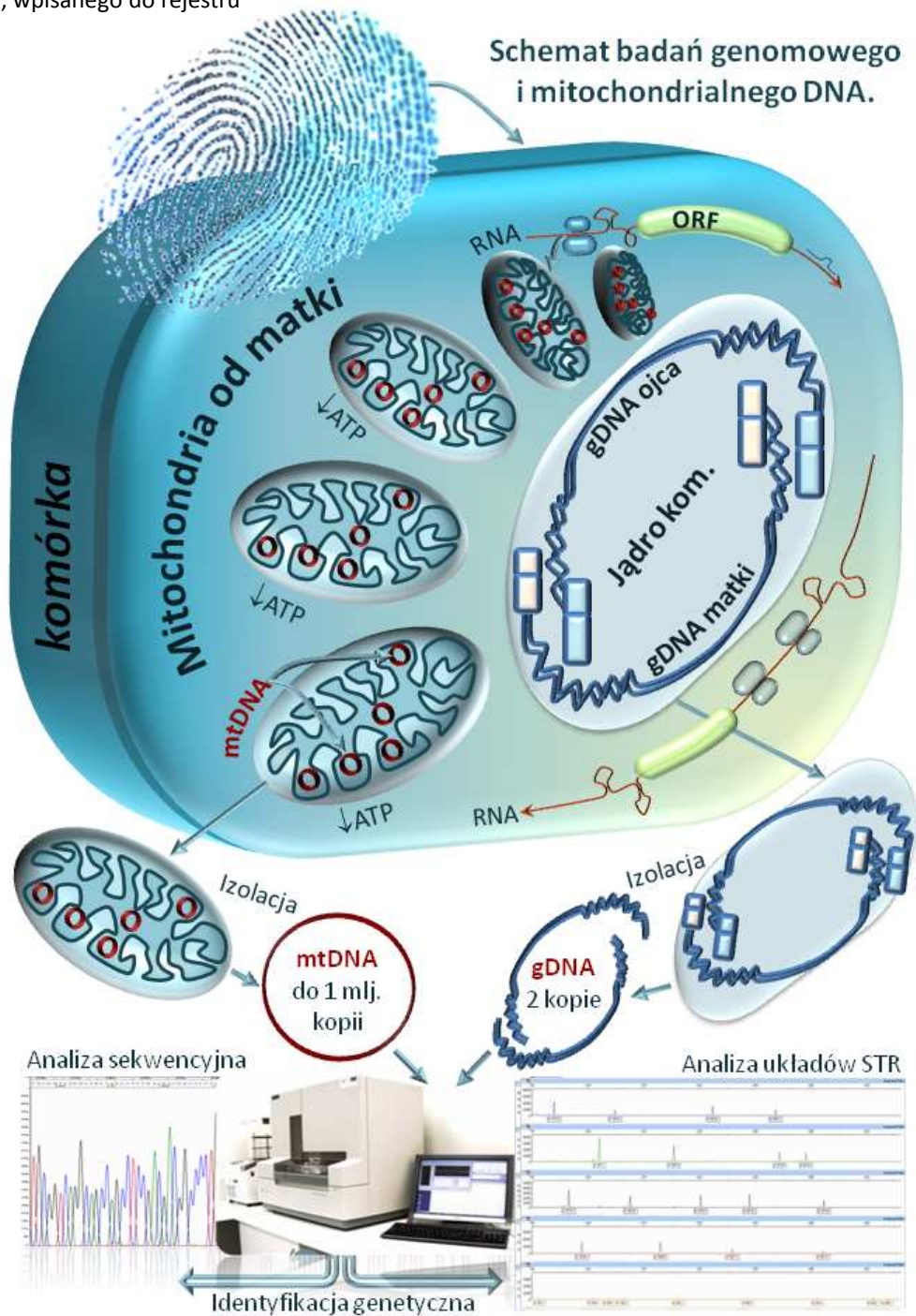
Salas, H.-J. Bandelt, V. Macaulay, M.B. Richards, *Phylogeographic investigations: The role of trees in forensic genetics*, 3 May 2007 Forensic Science International,

H. Andréasson, M. Nilsson, B. Budowle, H. Lundberg, M. Allen et al., *Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials* 1 December 2006 Forensic Science International,

Yong-Gang Yao, Claudio M Bravi, Hans-Jürgen Bandelt *A call for mtDNA data quality control in forensic science* 20 April 2004 Forensic Science International,

Peters, F.T., Drummer, O.H., Musshoff, F. *Validation of new methods* Forensic Sci Int. 2007 Jan 17;165(2-3):216-24. Epub 2006 Jun 16.

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.



Przygotował zespół BioTe21: Adam Master, Kamilla Giżewska, Maria Wesołowska, Łukasz Pindel, Agnieszka Gudek, Ewelina Żabicka, Agnieszka Niemiec i inni. Kraków, 01.03.2011