

Genetický polymorfismus jako nástroj identifikace osob v kriminalistické a soudně-lékařské praxi

doc. RNDr. Ivan Mazura, CSc.





Historie forenzní genetiky

1985-1986

Alec Jeffreys a satelitní DNA



- 1980 – Ray White popisuje první polymorfní RFLP marker
- 1985 – Alec Jeffreys objevuje první VNTR multilokusové polymorfismy
- 1985 – PCR reakce popsána
- 1988 – FBI poprvé používá DNA analýzu pro případ s kriminálním podtextem
- 1990 – první zmínka o „short tandem repeats“ polymorfismech v odborné literatuře
- 1996 – zpráva FBI pro kongres USA hovoří o přínosu DNA analýzy, jak pro potvrzení pachatele, tak pro včasné vyloučení osob z podezření

Forenzní případy sledované zahraničními médii



- 1986 - Alec Jeffreys řeší případy identifikace emigrantů a krátce poté i případ dvojnásobné vraždy pomocí VNTR – polymorfismů
- 1988 – opakovaná znásilnění mladých žen potvrzena genetickou analýzou v případě Tommy Lee Andrews vs. Stát Florida
- 1994 - dvojnásobná vražda mladé ženy a mladého muže s vyšetřováním podezřelé osoby, hráče amerického fotbalu a neúspěšného herce O.J.Simpsona

Současná laboratorní praxe forenzní genetiky– 3 etapy identifikace vzorku

Sample Obtained from
Crime Scene or Paternity
Investigation

BIOLOGY

DNA
Extraction



DNA
Quantitation



PCR Amplification
of Multiple STR markers

TECHNOLOGY

Separation and Detection
of PCR Products
(STR Alleles)



Sample Genotype
Determination

GENETICS

Comparison of Sample
Genotype to Other
Sample Results



If match occurs,
comparison of DNA profile
to population databases



Generation of Case
Report with Probability
of Random Match

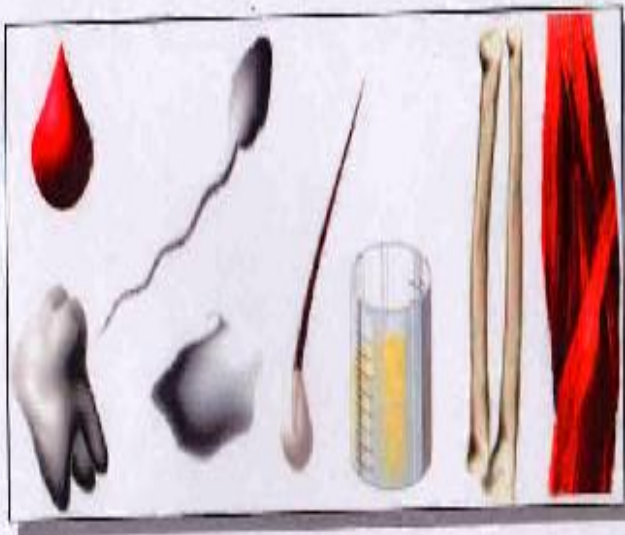
Biologie

The image features a dark blue background with a 3D grid of light blue spheres. The spheres are arranged in a perspective view, receding into the distance. The word "Biologie" is written in a bold, red, sans-serif font, centered in the upper half of the image. The text has a slight shadow effect, making it stand out against the grid.

Izolovaná kvalitní DNA jako nutná podmínka úspěšné forezní analýzy

Sources of Biological Evidence

- Blood
- Semen
- Saliva
- Urine
- Hair
- Teeth
- Bone
- Tissue



Type of Sample	Amount of DNA
Liquid blood	20 000–40 000 ng/mL
Blood stain	250–500 ng/cm ²
Liquid semen	150 000–300 000 ng/mL
Post-coital vaginal swab	10–3000 ng/swab
Plucked hair (with root)	1–750 ng/root
Shed hair (with root)	1–10 ng/root
Liquid saliva	1000–10 000 ng/mL
Oral swab	100–1500 ng/swab
Urine	1–20 ng/mL
Bone	3–10 ng/mg
Tissue	50–500 ng/mg

Lidský genom a jeho variabilita

- Sekvenční polymorfismy používány méně často, ale také v ojedinělých případech mohou pomoci
- Délkové polymorfismy používány v každodenní rutinní praxi jako nástroj „identifikační“ genetiky

(a) Sequence polymorphism

.....AGACTAGACATT.....

.....AGATTAGGCATT.....

(b) Length polymorphism

.....(AATG)(AATG)(AATG).....

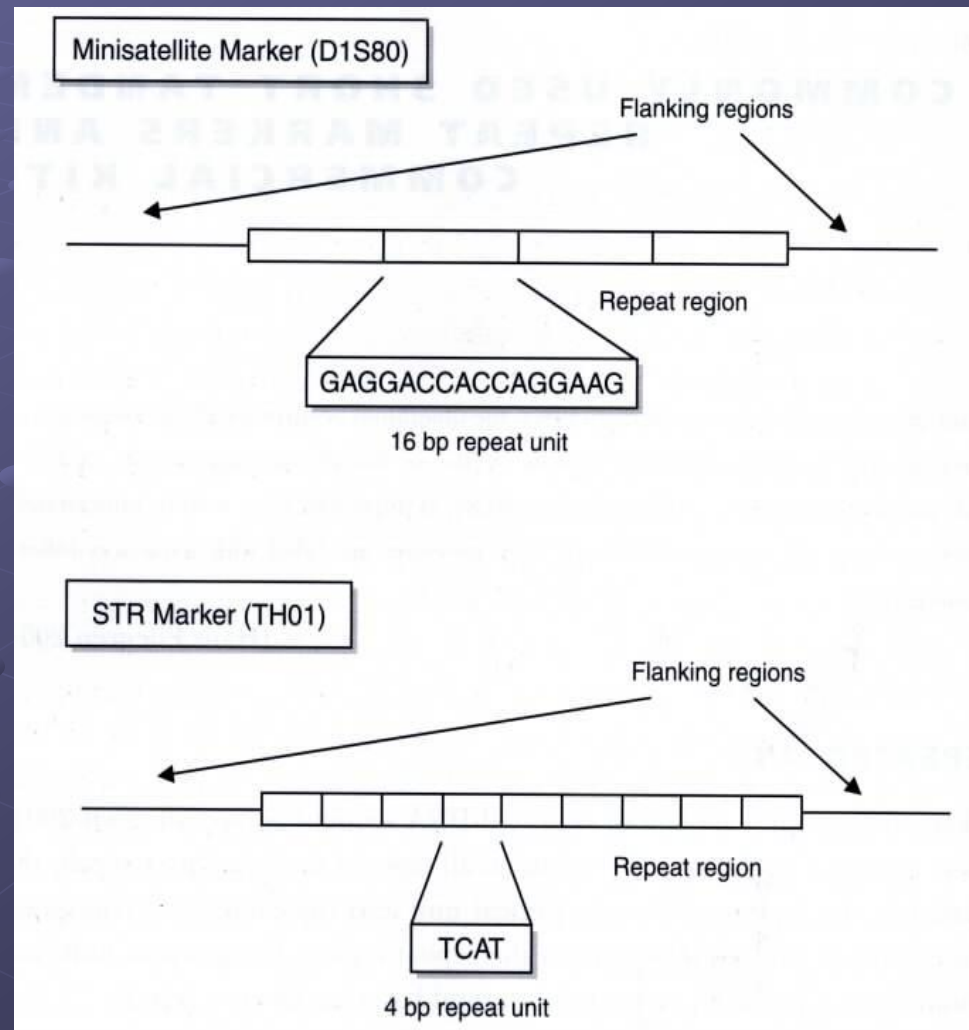
3 repeats

.....(AATG)(AATG).....

2 repeats

Satelitní – Minisatelitní - Mikrosatelitní DNA

- **Satelitní DNA** dnes již nepoužívána (repet.motiv do 1000 bp)
- **Minisatelitní DNA** dnes používána jako doplněk mikrosatelitních polymorfismů (repet.motiv do 100 bp)
- **Mikrosatelitní DNA** dnes používána jako běžný identifikační zdroj (repet.motiv do 10 bp)

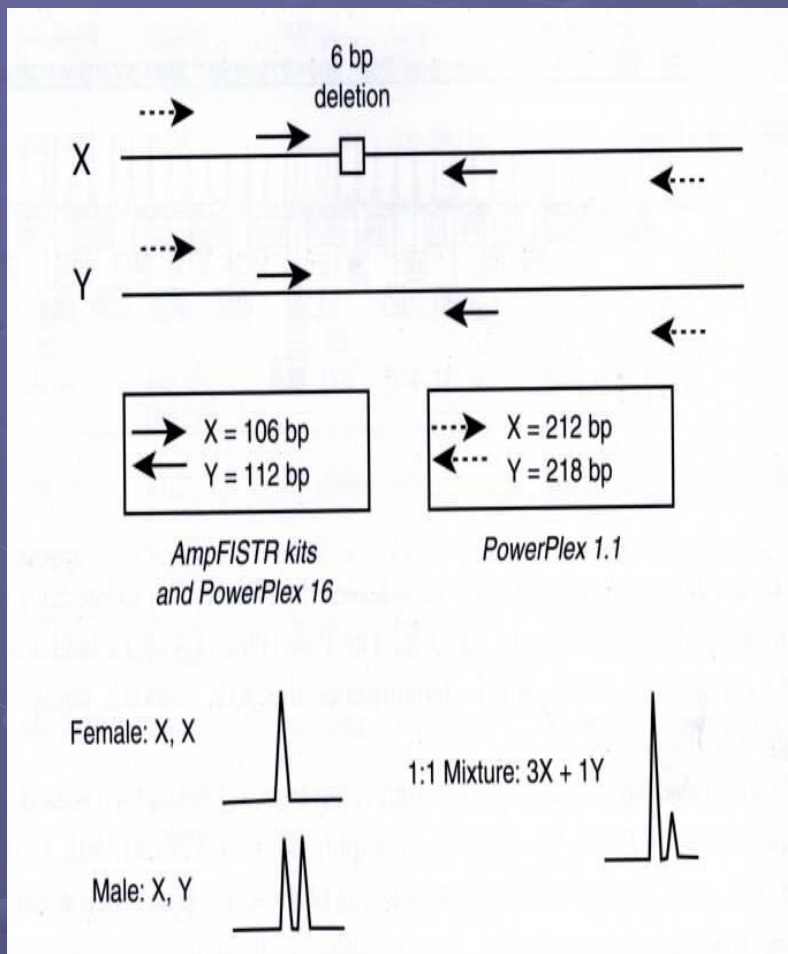


Co jsou STR- /Short Tandem Repeats/ polymorfismy?



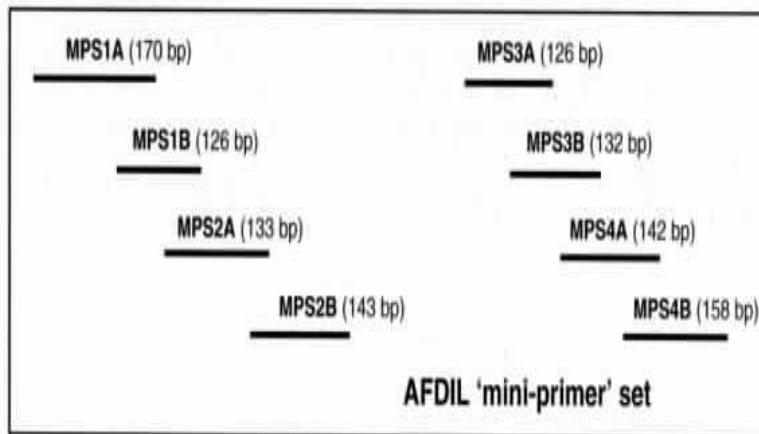
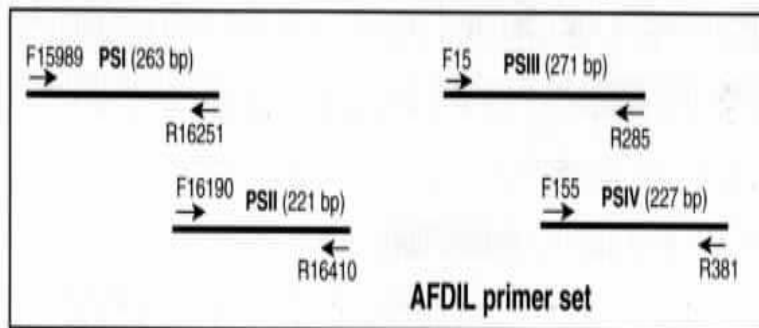
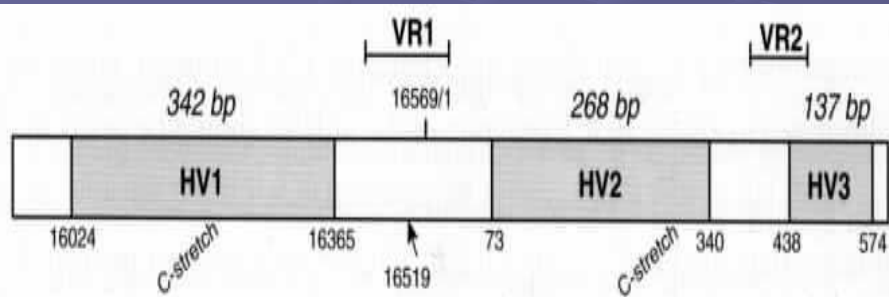
- STR sekvence-mikrosatelity
- Nejčastější opakování 2-6 nukleotidů
- Známo přes 20.000 tetra-nukleotidových sekvencí STR
- Známo více než 1 milion všech STR polymorfismů
- STR – polymorfismy zaujmají cca 3% celého lidského genomu

Určování pohlaví



- Gen pro Amelogenin
- Identifikační systém založený na 6 bp delecii v tomto genu lokalizovaném na chr. X
- Žena: XX – 1 signál
- Muž: XY- 2 signály stejné velikosti
- Směs vzorků: 2 nestejně velké signály

Polymorfismy v mitochondriální DNA



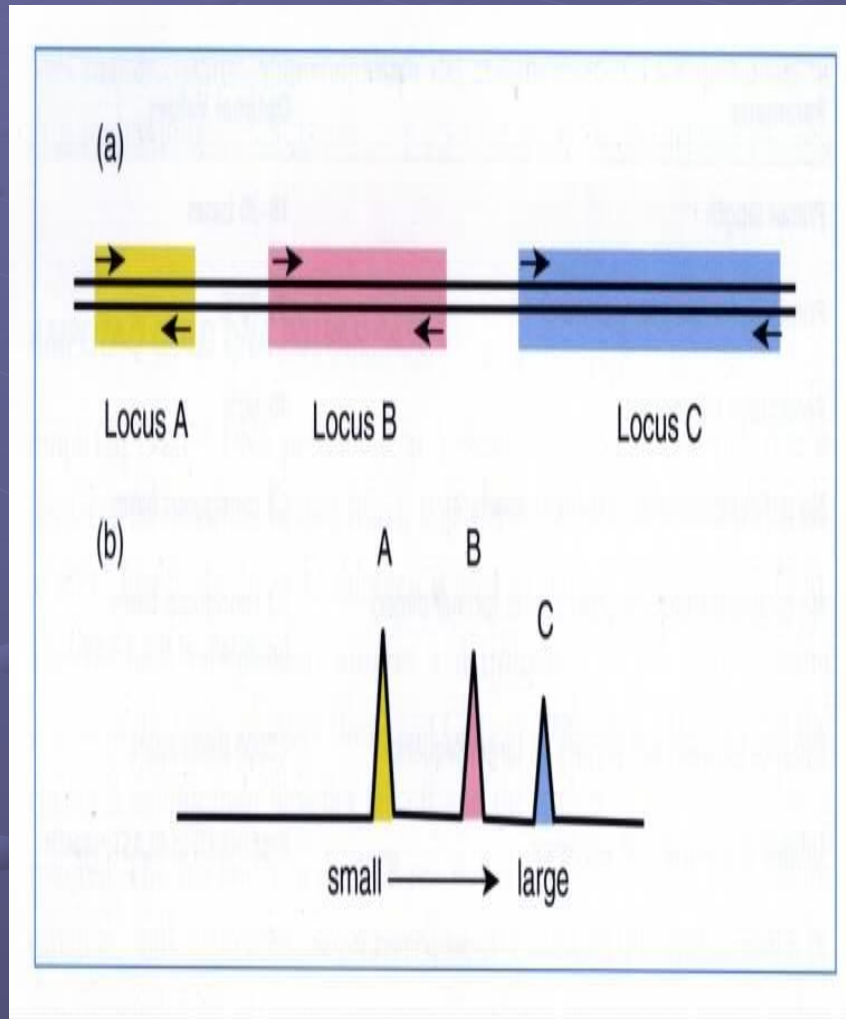
- 1995-1996 – studium možností podrobného využití některých oblastí mtDNA pro forenzní účely a tvorbu haploskupin v populacích

- Výhoda analýz těchto molekul je jejich rozměr a kruhová struktura

A 3D grid of spheres on a blue background. The spheres are arranged in a regular, repeating pattern that recedes into the distance, creating a sense of depth. The spheres are light blue and connected by thin, light blue lines. The background is a solid, dark blue color.

Technologie

Schéma principu identifikace pomocí 3 polymorfních lokusů

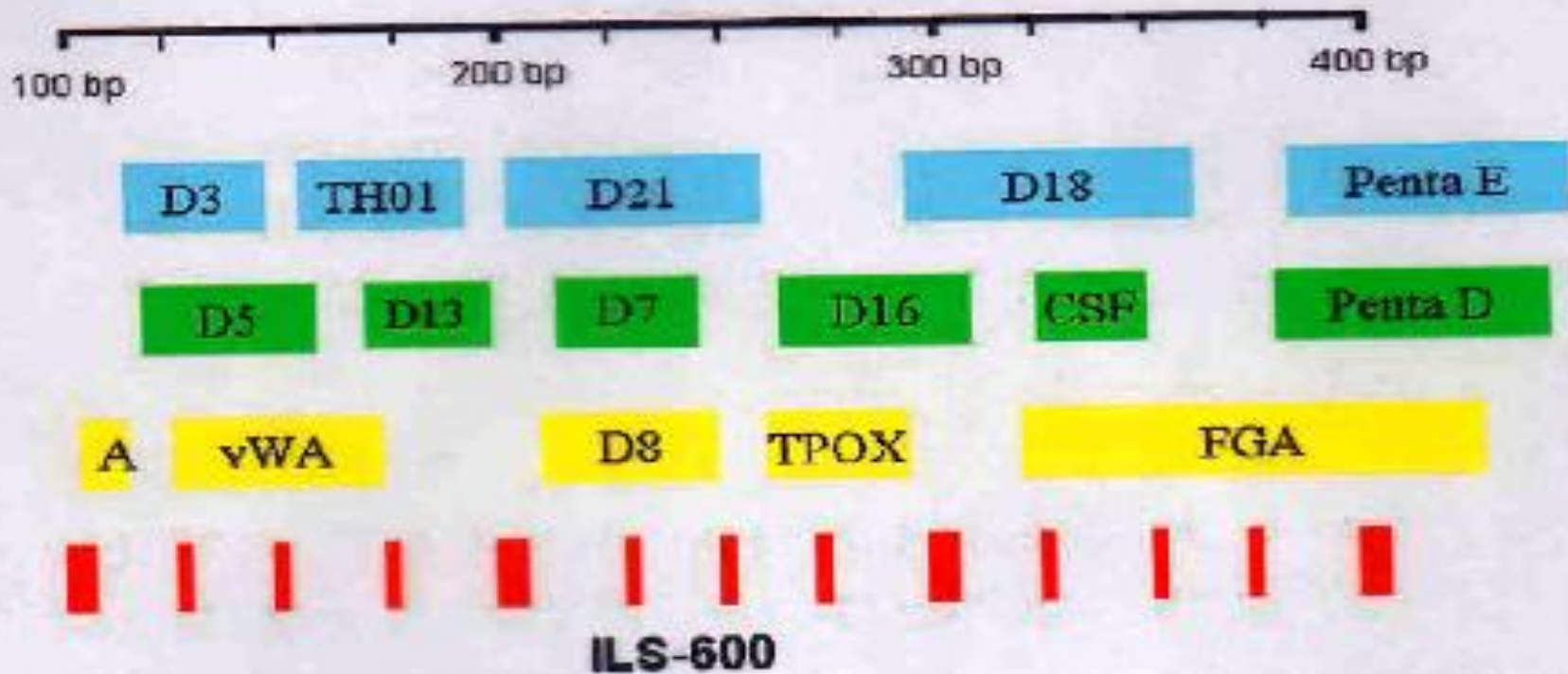


- Schéma principu „multi-plex PCR“ o 3 genetických lokusech
- Příprava systému 3 různě dlouhých amplifikátů s různými fluorescenčními značkami
- Detekce délkových polymorfismů pomocí kapilární elektroforézy

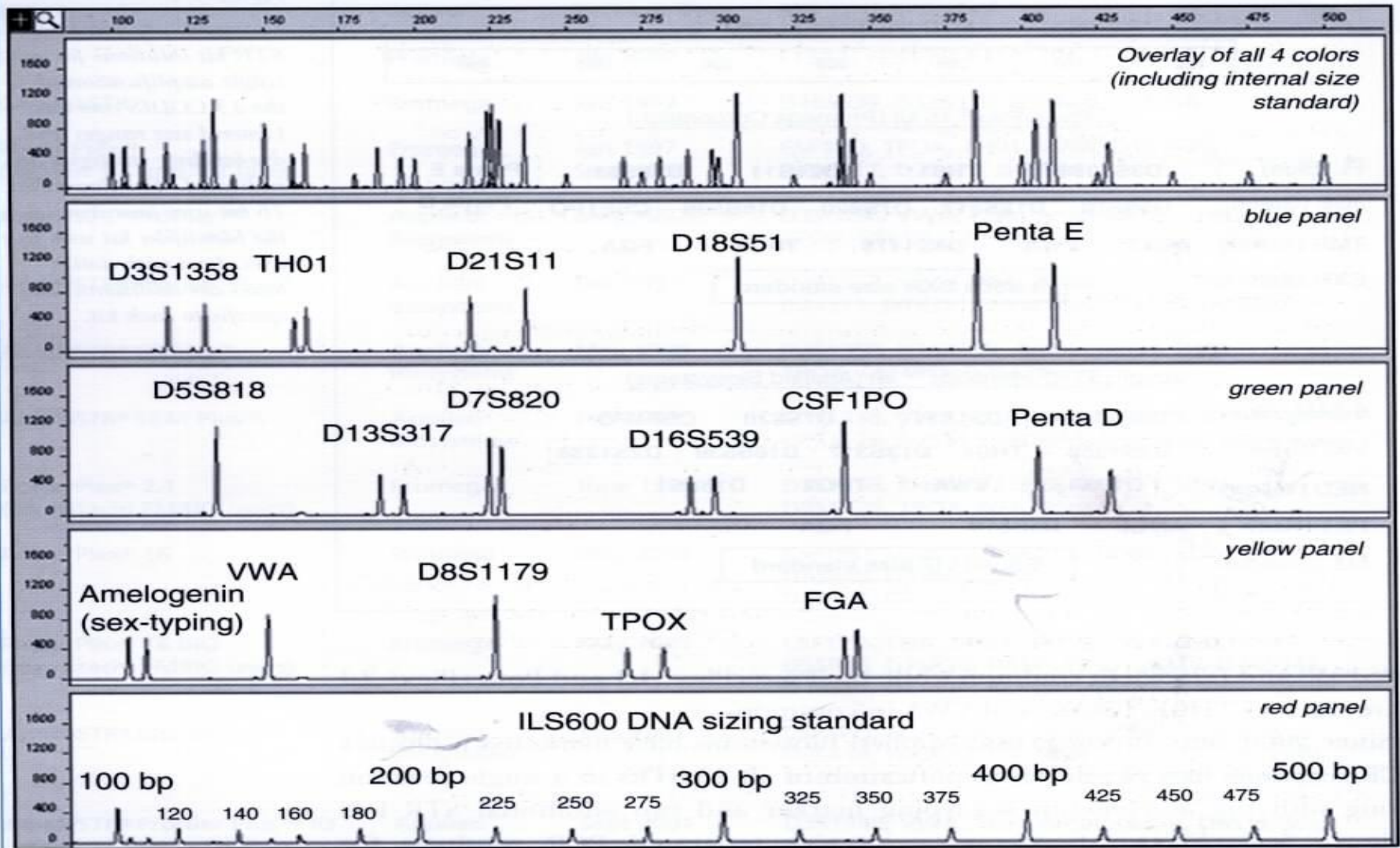
Schéma komerční soupravy pro forenzní identifikace

Current Forensic STR Multiplexes

PowerPlex™ 16



Příklad genetického STR - profilu jediného vzorku

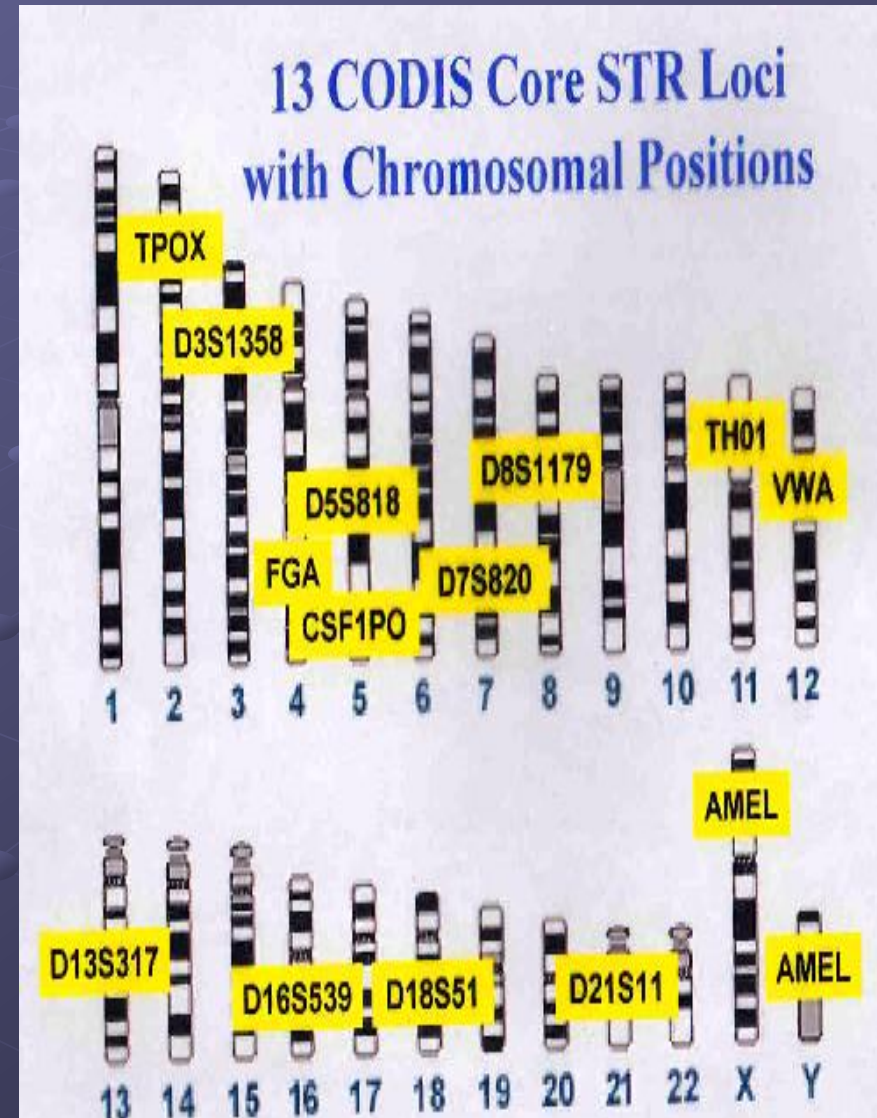


CODIS systém

- Nutnost srovnávání stejných lokusů v různých zemích světa
- 1998- shoda na 13 základních STR markerech
- Nejprve 50 států USA a později i další země Evropy, Asie a Austrálie
- Počátek tvorby národních databází

Schéma rozložení chromozomálních pozic STR-polymorfismů

- Nezávislé genetické polymorfismy
- Pouze chromosom 5 má 2 polymorfní místa s vysokou informativitou
- Konkrétní geny např. Tyrosin hydroxyláza, von Willebrand antigen, či thyroïd peroxidáza a další
- Amelogenin určující pohlaví jedince či vzorku



Příklady popisu dalších polymorfních míst

Locus Name	Chromosomal Location	GenBank Accession	Repeat ISFG format	Allele Range	Amplicon Size Range	Reference
D6S477	6pter-qter	G08543	TCTA	13.2–22	206–240 bp	Carracedo and Lareu (1998)
D7S809	7pter-qter	X73290	(AGGA) (AGGC)	9 alleles	241–289 bp	Tamaki <i>et al.</i> (1996)
D8S347	8q22.3–24.3	L12268	AGAT	16–28	340–388 bp	Poltl <i>et al.</i> (1997)
D8S639	8p21–p11	L24797	(AGAT) (AGGT)	20–33.3	316–371 bp	Seidl <i>et al.</i> (1999)
D9S302	9q31–33	G08746	ATCT	17 alleles	255–353 bp	Carracedo and Lareu (1998)
D10S2325	10pter-qter	G08790	TCTTA	6–17	113–168 bp	Wiegand <i>et al.</i> (1999)
D11S488	11q24.1–25	L04732	(AAAG) (GAAG)	26–41	242–302 bp	Seidl <i>et al.</i> (1999)
D11S554	11p11.2–12	M87277	AAAG	Complex	176–286 bp	Dupuy and Olaisen (1997)
D12S391	12	G08921	(AGAT) (AGAC)	15–26	209–253 bp	Lareu <i>et al.</i> (1996)
D12S1090	12q12	Not found	GATA	9–33	212–306 bp	Lifecodes
D18S535	18pter-qter	G07985	GATA	9–16	130–158 bp	Wiegand <i>et al.</i> (1999)
D18S849	18q12–q21	G07992	GATA	9–20	93–133 bp	Lifecodes
D19S433	19q12–13.1	G08036	AAGG	9–17.2	106–140 bp	SGM Plus, Identifiler
D20S161	20pter-qter	L16405	TAGA	14–22	156–187 bp	Hou <i>et al.</i> (1999)
D22S683	22pter-qter	G08086	(TA) (TATC)	12–21.2	168–206 bp	Carracedo and Lareu (1998)
DXS6807	Xpter–p22.2	G09662	GATA	11–17	251–275 bp	Edelmann and Szibor (1999)

Inhibitory amplifikace

Possible Forensic Source	PCR Inhibitor	Reference
Blood	Heme (hematin)	Akane <i>et al.</i> (1994)
Tissue and Hair	Melanin	Eckhart <i>et al.</i> (2000)
Feces	Polysaccharides	Monteiro <i>et al.</i> (1997)
Feces	Bile salts	Lantz <i>et al.</i> (1997)
Soil	Humic compounds	Tsai and Olson (1992)
Urine	Urea	Mahony <i>et al.</i> (1998)
Blue jeans	Textile dyes (denim)	Shutler <i>et al.</i> (1999)

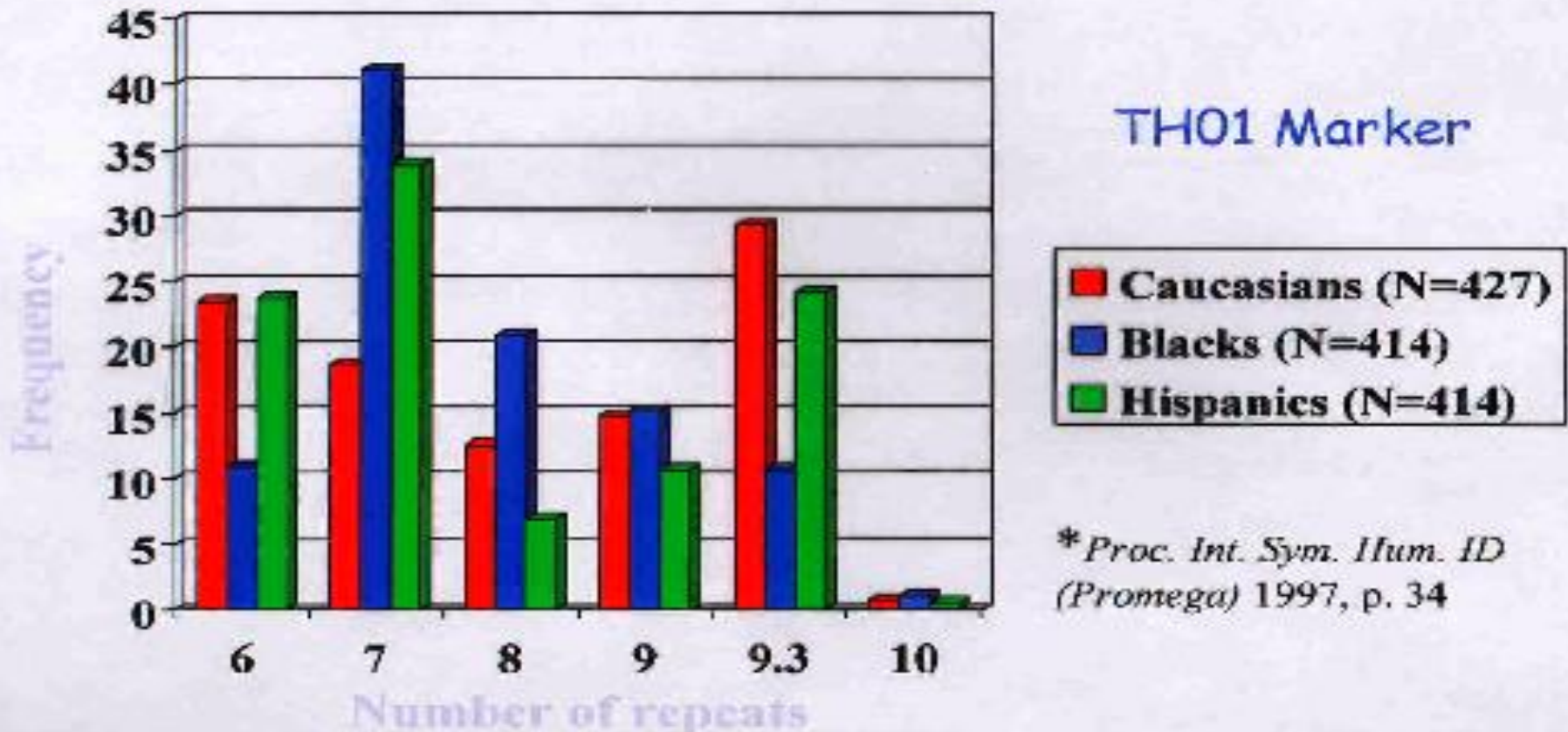
- Většinou jsou ztraceny některé alely či kompletní profil jedince
- Vazba inhibitorů do cílových „primerových“ sekvencí
- Možnost odstranit ředěním či přidáním většího množství polymerázy, která se váže do inhibitorů a tím je inaktivuje

A 3D grid of spheres on a blue background. The spheres are arranged in a regular, repeating pattern that recedes into the distance, creating a sense of depth. The spheres are light blue and connected by thin, light blue lines. The background is a solid, dark blue color.

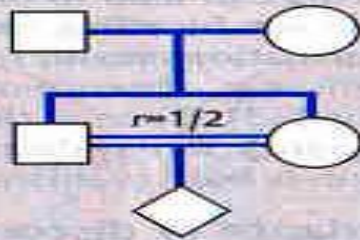
Genetika

Nutnost znalosti alelických frekvencí v dané populaci

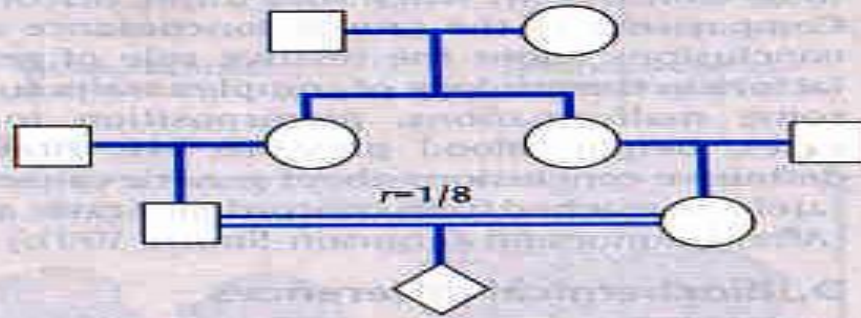
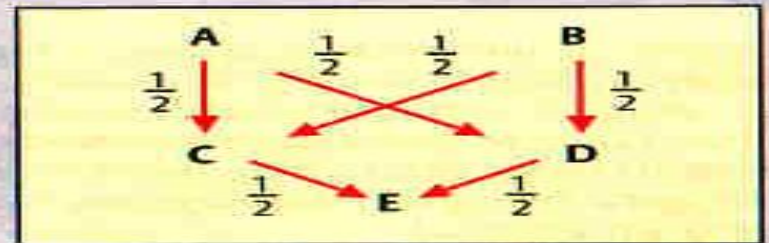
STR Allele Frequencies



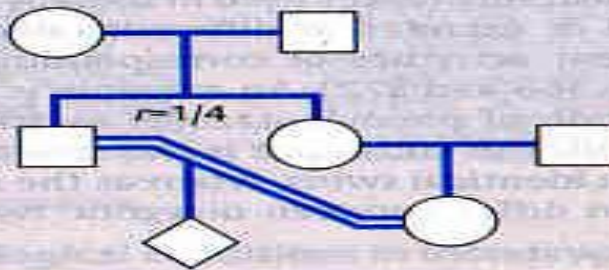
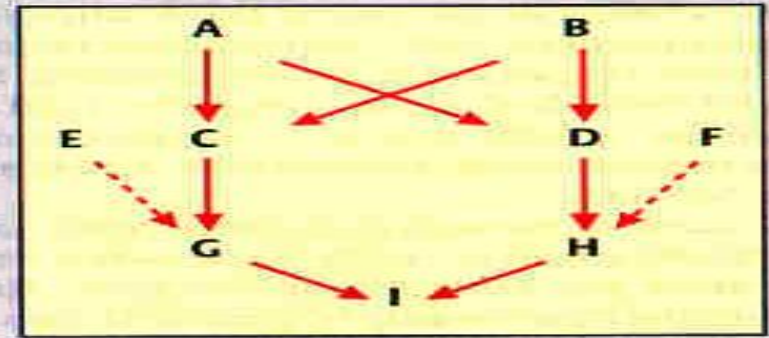
Pokrevní příbuznost, její varianty - kosanguinita



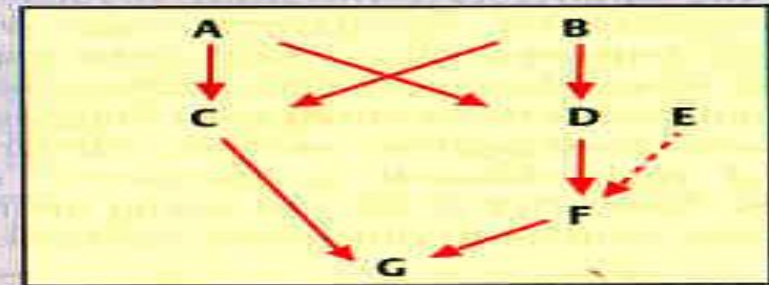
1. Brother/sister mating



2. First cousins



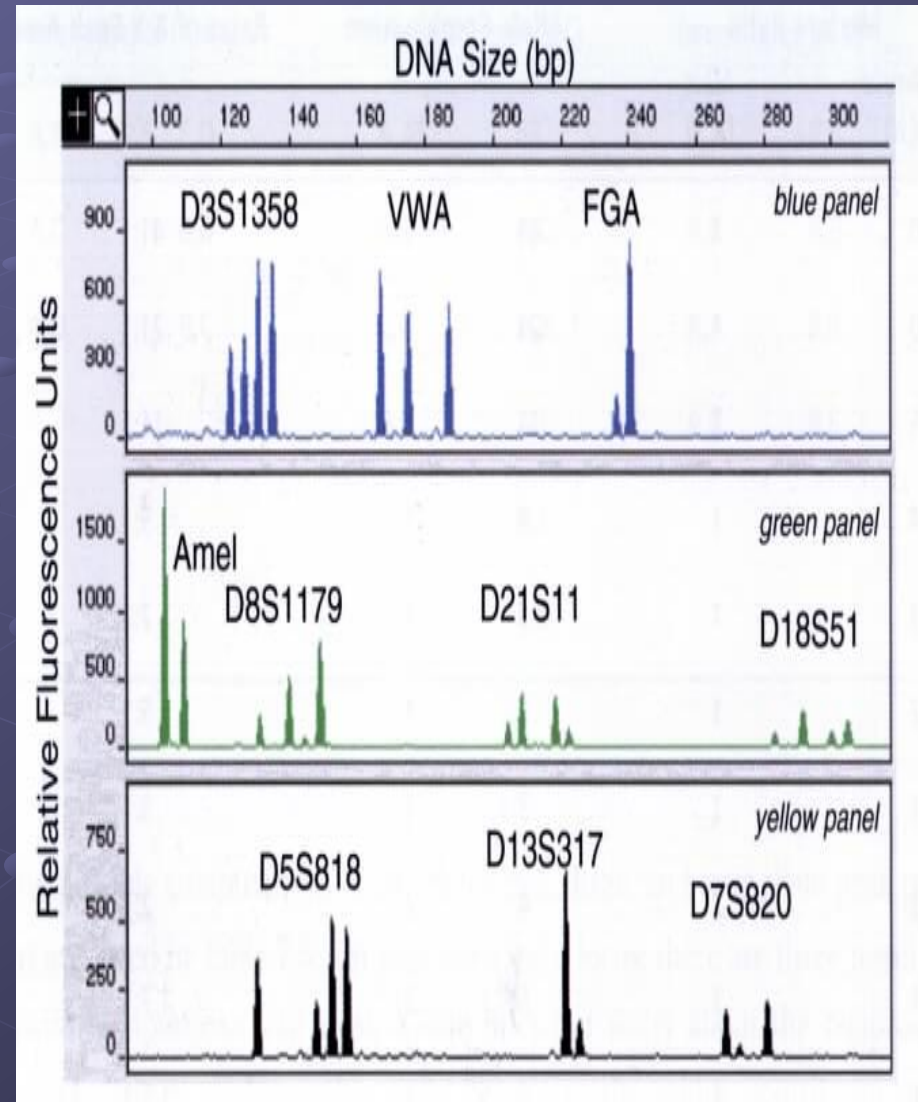
3. Uncle/niece



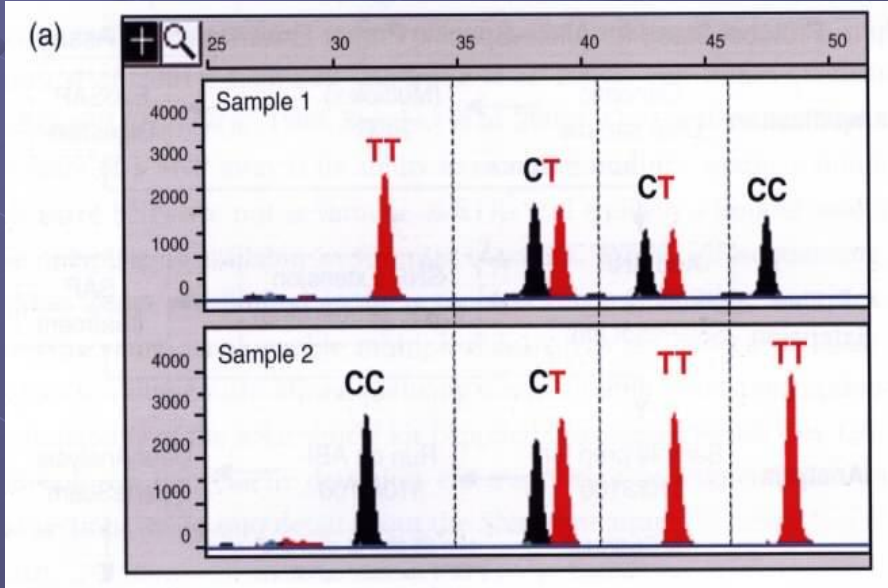
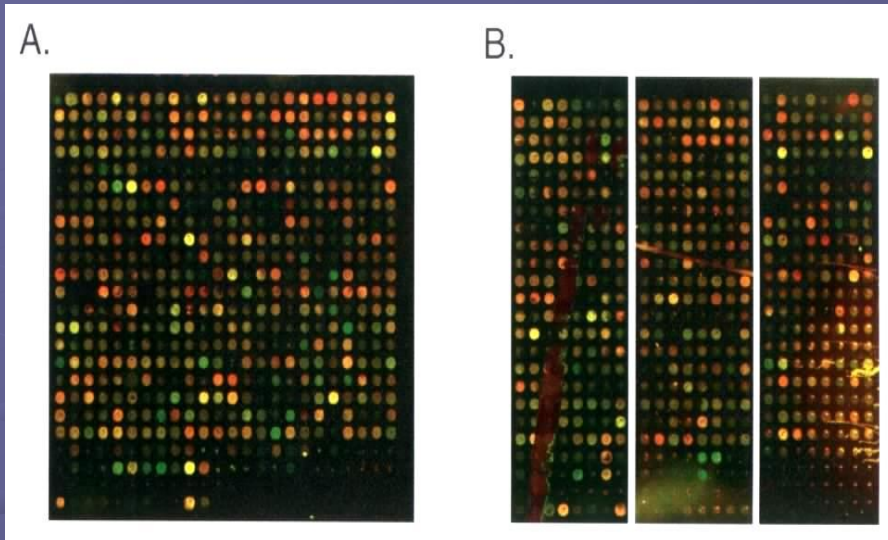
A. Simple types of consanguinity

Příklady směsných vzorků

- Klasické profily , které je možné vidět ve **směsných vzorcích** běžných případů forenzní genetiky
- Charakteristická je **imbalance ve velikosti vrcholů X a Y alel** v AME genu
- Stejně jako **3 či 4 vrcholy alel** dalších autosomálních markerů



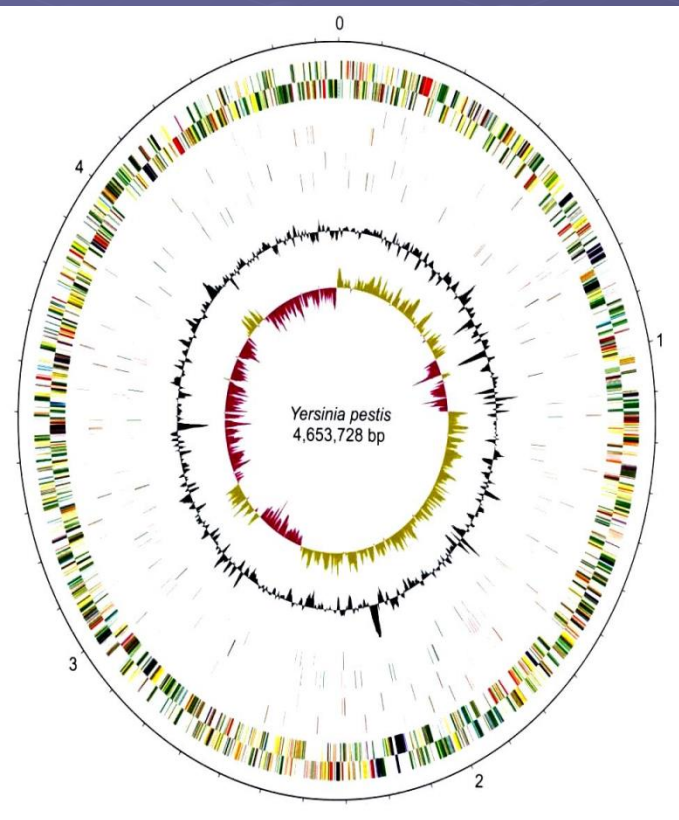
Single nucleotide polymorphisms



- SNP v budoucnosti významným nástrojem identifikace osob a vzorků
- Velkou výhodou pro degradované tkáně, kterých je ve forenzní genetice velké procento
- Možnost analýzy SNP na fenotypové znaky (např. rudá barva vlasů, modré oči atd.).

Identifikace ve forenzní mikrobiologii

Teroristické útoky biologickými zbraněmi:



- *Yersinia pestis* (mor) testování několik set let starých kosterních fragmentů
- *Mycobacterium tbc* (tuberkulóza)
- *Bacillus anthracis* (anthrax)
- *Salmonella typhimurium* (těžké průjmové stavy)

Příklady využití identifikace lidské DNA v každodenní praxi



- Možnosti porovnání DNA profilů podezřelých osob s profily v databázích
- Testování otcovství a mateřství
- Analýza historické DNA
- Identifikace pohřešovaných osob
- Identifikace osob při hromadných neštěstích
- Identifikace osob v průběhu vojenských operací

Forenzní genetika v roce 2013



- Genetickými identifikacemi se zabývá mnoho státních laboratoří
- V některých zemích jsou využívány rovněž laboratoře privátní
- Analyzovány jsou ročně desítky tisíc vzorků DNA
- Řada zemí Evropy a Asie má své vlastní forenzně genetické programy
- Objevují se další např. “wild-life“ forenzně genetické laboratoře