

Identifikacija tkivnih vzorcev z molekularno-biološkimi metodami

Irena Zupanič Pajnič, Jože Balažič, Radovan Komel, Rastko Golouh

V kirurški patologiji je razumljivo, da lahko postavimo pravilno diagnozo pri bolniku le tedaj, če dobimo v preiskavo njegov vzorec. Ena najpomembnejših zahtev pri tem delu je torej pravilna identifikacija tkivnih vzorcev in njihova pravilna oznaka. Čeprav so sistemi označevanja na strani kirurga, transporta in označevanje na strani patologa vsak posebej preizkušen in ves čas nadzorovan, se lahko zgodi, da vzorec med potjo od bolnika do mikroskopa napačno označimo ali pa oznako izgubimo.

Ker gre v kirurški patologiji za diagnostične procese, in ne za enostavno tehnologijo, ni mogoče pričakovati, tako kot še vedno misli laična publika pa tudi nekateri zdravniki, »ničelnega« standarda, standarda, kjer pri dobrem delu ni napak. Kakšna je verjetnost napak, lahko sklepamo tudi iz obsega dela, saj izdelamo na Oddelku za patologijo Onkološkega inštituta letno za diagnozo 5800 kirurških biopsij, kar je več kot 95.000 histoloških preparatov vseh vrst. Na vsakem preparatu je povprečno sedem identifikacijskih števil.

Kljub nadzoru dela se lahko zgodi, da biopsijske vzorce različnih bolnikov po pomoti zamenjamo. Na Oddelku za patologijo smo imeli v obdobju med 1992 in 2001 15 takih primerov. V devetih primerih smo odkrili zamenjavo pri biopsijah kostnega mozga in šestkrat pri drugih vzorcih. V dodatnih 11 primerih smo iz tehničnih razlogov izgubili oznake na kasetah s tkivom. Vsakega od teh problemov smo uspeli rešiti. Kadar pa zamenjamo majhne vzorce istovrstnega materiala (odščipi pri endoskopskih preiskavah, biopsije kostnih mozgov, bezgavke), se lahko zgodi, da bo ponovna identifikacija vzorca, čeprav na zamenjavo upravičeno sumimo, kljub obširni in natančni analizi dogodkov od operacije do laboratorijskih obdelav, nemogoča. Ker so lahko posledice zamenjave usodne, si želimo v takih primerih zanesljivejših načinov določanja, kateremu od bolnikov pripada biopsijski vzorec.

Od začetka devetdesetih let lahko v takih primerih že uporabljamo molekularno-biološke metode.

Metoda genetskega profiliranja, pri kateri določamo alelne vzorce ali genetske profile, je najbolj zanesljiva metoda identifikacije biološkega materiala in preverjanja bližnjih sorodstvenih povezav. Prvič v zgodovini identifikacijskih metod nam namreč omogoča pozitivno identifikacijo, in ne le izključitve.

Prva genetska identifikacijska metoda, ki jo je leta 1985 v Veliki Britaniji razvil Alec Jeffreys, je temeljila na preiskavi minisatelitnih polimorfizmov. V začetku devetdesetih let so razvili metodo genetskega profiliranja, pri kateri tipiziramo mikrosatelite ali kratke tandemske ponovitve. Označimo jih

s kratico STR (angl. Short Tandem Repeat), pomnožujemo pa jih v verižni reakciji s polimerazo – PCR (angl. Polymerase Chain Reaction). Zaradi bistveno hitrejših analiz in možnosti reševanja primerov, za katere je značilna izredno majhna količina DNK (identifikacija bioloških sledov, kot so slina s cigaretne ogorka, slina s pošne znamke, prhljaj, nohti in lasje s koreninico), se je ta metoda močno razširila in jo danes uporablja večina forenzičnih genetskih laboratorijev.

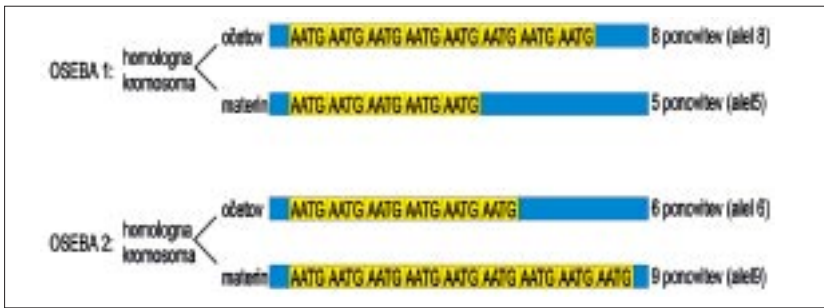
Tudi metoda, ki smo jo uvedli v genetskem laboratoriju Inštituta za sodno medicino Medicinske fakultete v Ljubljani, temelji na preiskavi mikrosatelitnih dolžinskih polimorfizmov molekule DNK. Pri preiskavi 14 lokusov STR dobimo za vsakega posameznika edinstven vzorec alelov, ki je osebno specifičen in ga imenujemo genetski profil. Pri identifikacijskih testih dosežemo verjetnost ujemanja naključno izbrane osebe z genetskim profilom analiziranega biološkega vzorca 1 v 10^{15} . V primerjavi z velikostjo celotne človeške populacije (6×10^9) kaže ta verjetnost edinstvenost genetskih profilov.

Za določanje spola pomnožujemo v forenzičnih vzorcih s PCR odsek amelogeninskega gena.

MIKROSATELITI ALI LOKUSI STR

Mikrosateliti ali lokusi STR so področja človeškega genoma, v katerih se ljudje med seboj najbolj razlikujemo. Lokusi STR pripadajo nekodogeni DNK in ne kodirajo proteinov. Raztreseni so po vsem genomu. So nevtralni, ker ne nosijo nobene informacije o posamezniku, omogočajo pa ugotavljanje identitete. Variabilnost lokusov STR je znotraj populacije tako visoka, da lahko z uporabo večjega števila lokusov med seboj razlikujemo katerikoli osebi, razen enojajčnih dvojčkov. Lokusi STR imajo obliko kratkih, tandemske ponovljenih nukleotidnih zaporedij, t.i. osnovnih motivov, ki se ponavljajo v številnih identičnih ali sorodnih kopijah. Polimorfizem lokusov STR torej temelji na variacijah v številu ponovitev osnovnega motiva. Posledica je visoka variabilnost v dolžinah posameznih alelov, kar opišemo kot dolžinski polimorfizem. Dolžina osnovnega motiva vseh 14 lokusov STR, ki jih na Inštitutu za sodno medicino uporabljamo pri rutinskih preiskavah, so štirje bazni pari, zato govorimo o tetranukleotidnih lokusih, njihova dolžina pa ne presega 400 baznih parov.

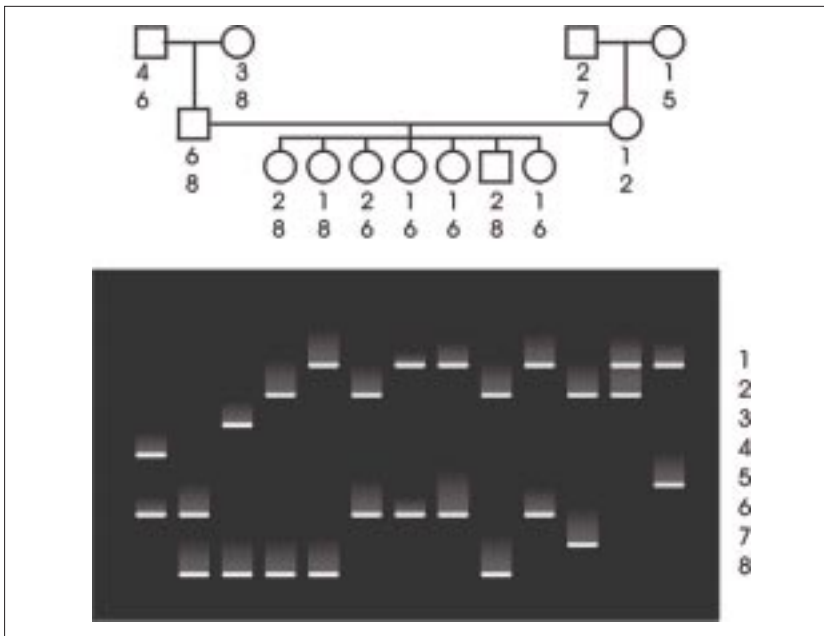
Na sliki 1 je shematsko prikazan dolžinski polimorfizem lokusa TH01. Osnovni motivi so obarvani rumeno, njihovo nukleotidno zaporedje je AATG, mejna področja lokusa pa so obarvana modro. Obe prikazani osebi imata zaradi različnega števila ponovitev osnovnega motiva na lokusu



Slika 1. Shematski prikaz dolžinskega polimorfizma lokusa HUMTH01.

različno dolge alele. Oseba 1 ima na enem kromosomu osem ponovitev osnovnega motiva in na homolognem kromosomu pet ponovitev, oseba 2 pa ima šest in devet ponovitev osnovnega motiva. Ker označimo alele s številom ponovitev osnovnega motiva, pravimo, da ima oseba 1 na lokusu TH01 alel 8 in alel 5, oseba 2 pa alel 6 in alel 9.

Rodovniške analize so pokazale, da se lokusi STR razporejajo neodvisno s staršev na potomce, kažejo kodominantno naravo alelov in se dedujejo strogo po Mendlovih zakonih dedovanja, po katerih otrok vedno podeduje en alel od matere in enega od očeta. Na sliki 2 je



Slika 2. Dedovanje lokusov STR.

prikazano dedovanje lokusov STR pri treh generacijah. V vsaki generaciji poskrbi spolno razmnoževanje za različne kombinacije alelov. Na načinu dedovanja lokusov STR temeljijo preverjanja spornih očetovstev in vse preiskave, pri katerih ugotavljamo bližnje sorodstvene povezave med posamezniki. Identifikacijski testi, pri katerih ne spremljamo načina dedovanja, ampak nas zanima, ali se genetski profili analiziranih vzorcev med seboj popolnoma ujemajo, pa temeljijo na predpostavki, da imajo vsa tkiva posameznika enak genotip.

Sodnomedicinske genetske preiskave sestavlja več korakov:

- izolacija genomske DNK iz različnega biološkega materiala,
- pomnoževanje lokusov STR in odseka amelogeninskega gena v PCR,
- ločevanje amplifikacijskih produktov s kapilarno elektroforezo in določanje genotipov analiziranih vzorcev ter
- ocenjevanje moči genetskega dokaza.

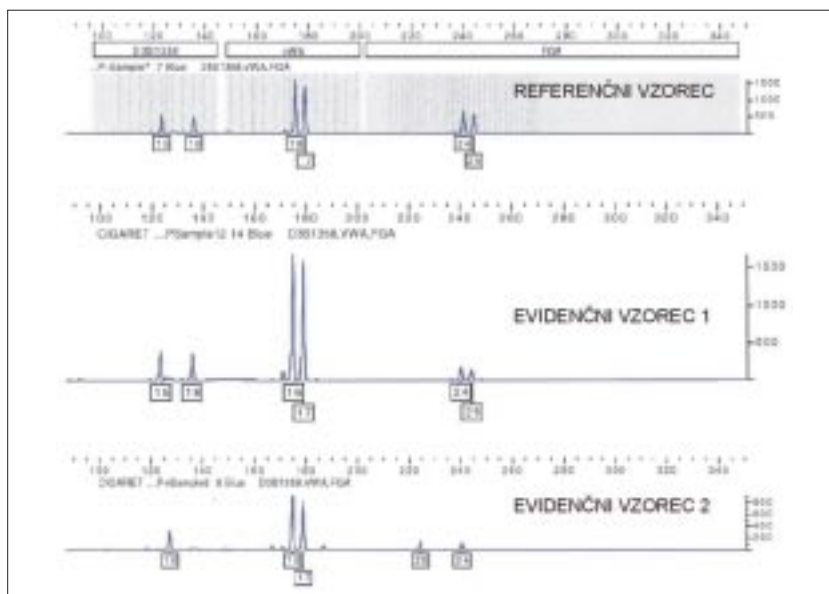
GENETSKO PROFILIRANJE PRI IDENTIFIKACIJI TKIVNIH VZORCEV

Kadar nas zanima, ali pripadajo tkiva v parafinskem bloku ali v histološkem preparatu isti osebi, moramo izolirati genomsko DNK iz vseh vprašljivih vzorcev in jim določiti genetske profile. Da bo odgovor pritrđen, se morajo genetski profili, dobljeni iz vseh tkiv, popolnoma ujemanjati na vseh 14 analiziranih lokusih STR. Če opazimo neujemanje na enem samem lokusu, vzorca ne pripadata isti osebi. Pri tem moramo biti pozorni na to, da v identifikacijske teste vključimo le tkiva, ki niso genetsko spremenjena. Veliko

pogostnost somatskih mutacij so namreč opazili prav v človeških tumorjih. Somatske mutacije povzročajo razlike v genotipih različnih tkiv istega osebk, kar privede do zapletov pri identifikacijah, saj te temeljijo na predpostavki, da imajo vsa tkiva posameznika enak genotip. To pomeni, da tumorjev ne smemo genotipizirati, saj so mikrosatelitna zaporedja v njih pogosto mutirana.

Če pa nas zanima, ali pripada neidentificiran tkivni vzorec določenemu pacientu, vzamemo pacientu malo krvi iz prsta in bris bukalne sluznice ter ju genotipiziramo. Dobljen genetski profil nato primerjamo z genetskim profilom tkiva v parafinskem bloku, katerega izvor ni popolnoma jase. Tkivni vzorec lahko pozitivno identificiramo le ob popolnem ujemanju dobljenega genetskega profila z genetskim profilom pacienta. Ponovno naj opozorimo, da za identifikacije z genetskim profiliranjem tumorji niso primerni; potrebno je analizirati neprizadeta tkiva.

Na sliki 3 je prikazan hipotetičen primer identifikacije tkivnih vzorcev. Referenčni vzorec predstavlja genetski profil znanega pacienta, evidenčni vzorec 1 in 2 pa genetska profila dveh tkivnih vzorcev, katerih identiteto preverjamo. Zaradi jasnejše predstave so na elektroferogramih prikazani le genetski profili treh lokusov STR, preiskavo pa seveda opravimo na vseh 14 lokusih STR. Ujemanje genetskih profilov opazimo med referenčnim vzorcem (pacient) in evidenčnim vzorcem 1 (tkivni vzorec 1). Oba vzorca imata na lokusu D3S1358 genotip 15/18, na



Slika 3. Primer identifikacije tkivnih vzorcev.

loku vWA 16/17 in na lokusu FGA 24/25. Tkivni vzorec 1 torej pripada znanemu pacientu, pri čemer mora biti ujemanje potrjeno na vseh 14 lokusih STR. Evidenčni vzorec 2 (tkivni vzorec 2) se na dveh prikazanih lokusih ne ujema z referenčnim vzorcem istega pacienta. Genotip referenčnega vzorca na lokusu D3S1358 je 15/18, evidenčnega vzorca 2 pa 16/16, na lokusu FGA je genotip referenčnega vzorca 24/25, evidenčnega vzorca 2 pa 20/24. Tkivni vzorec 2 zaradi neujemanja torej ne pripada temu pacientu.

PRIMERI FORENZIČNIH GENETSKIH IDENTIFIKACIJ

Trenutno potekajo v ZDA izredno obsežne genetske identifikacijske preiskave, kjer poskušajo s pomočjo zobnih ščetk in glavnikov pogrešanih oseb identificirati žrtve nedavnega terorističnega napada na Svetovni trgovinski center in na Pentagon.

Ena najbolj odmevnih in uspešnih forenzičnih genetskih raziskav je identifikacija ruske vladarske družine Romanov. Za pozitivno identifikacijo je bilo potrebno analizirati tako jedrno kot mitohondrijsko DNK (mtDNK). S pomočjo jedrne DNK so lahko preverili maternalno in paternalno povezanost družinskih članov, niso pa mogli odgovoriti na vprašanje, ali gre res za posmrtno ostanke družine Romanov. Jedrna DNK namreč omogoča le preverjanje bližnjih sorodstvenih odnosov. Preverjanje sorodnosti med daljnimi sorodniki, ki so med seboj ločeni z nekaj generacijami, pa zaradi rekombinacije ni možno. Edini način preverjanja daljnih sorodstvenih povezav je analiza mitohondrijske DNK, saj se ta deduje izključno po materi in se ne rekombinira. Pri družini Romanov so preverili identičnost skeletnih ostankov tako, da so primerjali nukleotidna zaporedja mitohondrijskih DNK z nekaj generacij oddaljenimi, še živečimi potomci po materini liniji. Referenčna oseba za identifikacijo carice Aleksandre

in njenih otrok je bil Princ Filip, vojvoda Edinburški, pranečak carice Aleksandre in mož angleške kraljice Elizabete II. Njegova mtDNK je bila identična caričini in mtDNK njenih otrok. Še živeči referenčni osebi za identifikacijo carja Nikolaja sta bila vnuk in vnukinja Luise Hesse Cassel in posmrtni ostanki carjevega brata Georgija Romanova, ki je umrl za tuberkulozo leta 1899 in so ga za potrebe te analize ekshumirali v katedrali Svetega Petra in Pavla v Sankt Peterburgu. Tudi tu so potrdili identičnost mitohondrijskih sekvenc.

Z analizo jedrne in mitohondrijske DNK so dokazali, da posmrtni ostanki v domnevem grobišču carske družine v resnici pripadajo družini Romanovih. V grobišču so našli posmrtne ostanke carja Nikolaja II., carice Aleksandre, treh njenih otrok, treh služabnikov in družinskega zdravnika. Car in carica sta imela štiri hčerke in sina. Vsi trije najdeni

otroški skeleti so ženskega spola. V grobišču sta torej manjkali trupli carjeviča Alekseja in ene od hčera, kar predvidevajo tudi zgodovinski viri. Pred časom je Delo objavilo novico, da so našli tudi posmrtne ostanke domnevnega sina in manjkajoče hčerke, tako da v kratkem pričakujemo v strokovni literaturi članek o genetski identifikaciji do sedaj manjkajočih članov družine Romanov, kar bi dokončno ovrglo kakršnekoli dvome o tem, da je najmlajša hči Anastazija preživela grozoviti poboj, o čemer je bilo veliko polemičnih razprav. V ZDA je Ana Anderson vse do svoje smrti leta 1984 trdila, da je Anastazija Romanov. Po uspešni identifikaciji posmrtnih ostankov Romanovih leta 1992 so z genetsko analizo biološkega materiala Ane Anderson (biopsijski vzorec črevesnega tkiva, ki so ga Andersonovi odvzeli leta 1979 in je bil shranjen v eni od bolnišnic v Virginiji) ovrgli kakršnokoli sorodstveno povezavo Andersonove z Romanovimi.

Literatura:

1. Jeffreys AJ. DNA typing: approaches and applications. *J Forensic Sci Soc* 1993; 33: 204-211.
2. Fowler JCS, Burgoyne LA, Scott AC, Harding HWJ. Repetitive deoxyribonucleic acid (DNA) and human genome variation - a concise review relevant to forensic biology. *J Forensic Sci*, 1988; 33: 1111-1126.
3. Hochmeister MN, Budowle B, Jung J, Borer UV, Comey CT, Dirnhofer R. PCR-based typing of DNA extracted from cigarette butts. *Int J Legal Med* 1991; 104: 229-233.
4. Fridez F, Coquoz R. PCR DNA typing of stamps: evaluation of the DNA extraction. *Forensic Sci Int*, 1996; 78: 103-110.
5. Herber B, Herold K. DNA typing of human dandruff. *J Forensic Sci* 1998; 43: 648-656.
6. Tahir MA, Watson N. Typing of DNA HLA-DQ α alleles extracted from human nail material using polymerase chain reaction. *J Forensic Sci* 1995; 40: 634-636.

7. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 1991; 10: 506-513.
8. Benecke M. DNA typing in forensic medicine and in criminal investigations: a current survey. *Naturwissenschaften* 1997; 84: 181-188.
9. Zupanič I, Balažič J, Komel R. Analysis of nine short tandem repeat (STR) loci in the Slovenian population. *Int J Legal Med* 1998; 111: 248-250.
10. Zupanič Pajnič I, Šterlanko H, Balažič J, Komel R. Parentage testing with 14 STR loci and population data for 5 STRs in the Slovenian population. *Int J Legal Med* 2001; 114: 178-180.
11. Trent RJ. Forensic medicine. In: Trent RJ. *Molecular Medicine - an introductory text for students*. London: Churchill and Livingstone, 1993: 177-192.
12. Inman K, Rudin N. *An introduction to forensic DNA analysis*. New York: CRC Press Inc, 1997: 256.
13. Zupanič I. Genetski detektivi: prepoznavanje oseb in preverjanje sorodstvenih povezav s pomočjo preiskave DNA. *Proteus* 1998; 60: 400-405.
14. Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ. *DNA fingerprinting: state of the science*. Basel, Boston, Berlin: Birkhauser Verlag, 1993: 466.
15. Committee on DNA Forensic Science, Commission on DNA Forensic Science, National Research Council. *The evaluation of forensic DNA evidence*. Washington: National Academy Press, 1996: 254.
16. Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, Sullivan K. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature Genetics* 1994; 6: 130-135.