

Zastosowanie analizy mitochondrialnego DNA w badaniach kryminalistycznych – perspektywy

Analiza mitochondrialnego DNA (mtDNA) jest rutynową metodą stosowaną w badaniach kryminalistycznych przy ustalaniu pokrewieństwa oraz w badaniach ewolucyjnych, antropologicznych i medycynie klinicznej. Znajduje swoje zastosowanie tam, gdzie standardowe genotypowanie w oparciu o układy mikrosatelitarne STR nie jest możliwe. W kryminalistyce takie badania wykonuje się w przypadku śladów biologicznych o dużym stopniu degradacji bądź śladów z natury zawierających małe ilości jądrowego DNA, takich jak kości, zęby czy trzony włosów. Ponadto niektóre sekwencje mtDNA pozwalają na określenie przynależności gatunkowej śladów pochodzenia zwierzęcego.

Budowa mitochondrialnego DNA

Mitochondrium jest organellą komórkową odpowiedzialną za dostarczanie energii komórce w procesie fosforylacji oksydacyjnej. Zawiera ono własny materiał genetyczny – kolistą dwuniciową cząsteczkę mitochondrialnego DNA o długości ok. 16 569 pz. [9]. Ewentualne różnice w długości wynikają m.in. z insercji lub delecji nukleotydów. Jedna z nici mtDNA została nazwana ciężką H (od ang. heavy) ze względu na dużą zawartość zasad purynowych, a druga lekką L (od ang. light) z powodu dużej zawartości zasad pirymidynowych. Mitochondrialne DNA różni się od jądrowego DNA pod wieloma względami (tab. 1). Z punktu widzenia badań kryminalistycznych głów-

nymi zaletami mtDNA są: duża liczba kopii w komórce i wyższa odporność na degradację w porównaniu z jądrowym DNA. Uważa się, że druga z wymienionych cech wynika z kolistej struktury mtDNA oraz przyjmowania przez niego konformacji superkręconej [8]. Cechy te pozwalają na uzyskanie wyników nawet z bardzo zniszczonego materiału, którego analiza z wykorzystaniem układów STR jądrowego DNA jest utrudniona lub niemożliwa.

W odróżnieniu od jądrowego DNA (jDNA) mtDNA nie jest związane z białkami histonowymi i nie zawiera intronów. MtDNA koduje 13 polipeptydów z ok. 80 podjednostek białkowych zaangażowanych w fosforylację oksydacyjną oraz 2 rRNA i 22 tRNA, co zapewnia mitochondriom

ograniczoną autonomię [1]. Główną różnicę stanowi sposób dziedziczenia: mtDNA dziedziczone jest wyłącznie w linii matczynej.

Wynika to z faktu, że mitochondria obecne w plemniku zawierające ok. 100 kopii mtDNA, po zapłodnieniu komórki jajowej, w której jest ok. 100 000 cząsteczek mtDNA, degenerują w wyniku niepoznanego dotąd dobrze mechanizmu [5]. Ponieważ mtDNA nie podlega rekombinacji sekwencja wszystkich krewnych w linii matczynej jest identyczna na przestrzeni wielu generacji (wyłączając przypadki mutacji, polimorfizmów i związanej z nimi heteroplasmii – patrz dalej). Dlatego sekwencja mtDNA traktowana jest jako pojedyncze locus lub tzw. haplotyp.

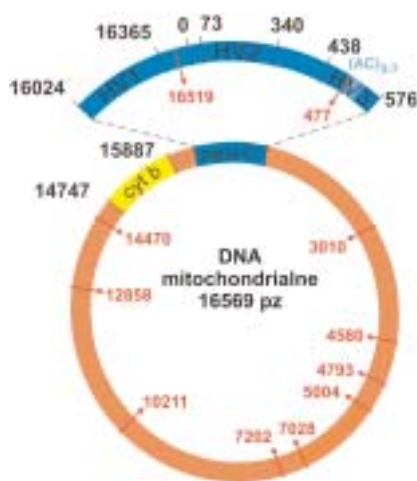
Tabela 1

Podsumowanie głównych różnic między mitochondrialnym i jądrowym DNA

The summary of basic differences between mtDNA and nuclear DNA

Cecha	mtDNA	DNA jądrowe
Lokalizacja	Mitochondria	Jądro komórkowe
Liczba kopii	50-kilku tys. kopii w komórce: 2 do 10 kopii na jedno mitochondrium	2 kopie w komórce
Struktura	Kolista dwuniciowa cząsteczka	Liniowa dwuniciowa cząsteczka
Długość	Ok. 16 569 pz	Ok. 3,2 mld pz
Procentowa zawartość regionu kodującego i niekodującego	Region niekodujący – ok. 7% genomu mitochondrialnego Region kodujący – ok. 93% genomu mitochondrialnego	Region niekodujący – ok. 97% genomu jądrowego Region kodujący – ok. 3% genomu jądrowego
Dziedziczenie	W linii matczynej	Od obojga rodziców
Źródło zmienności	Mutacje Brak zjawiska rekombinacji	Rekombinacja Mutacje

Genom mitochondrialny wyróżnia się wyższą częstością mutacji niż genom jądrowy. Przyczyną jest, jak się uważa, wysokie stężenie wolnych rodników uwalnianych się w trakcie wędrówki elektronów przez łańcuch oddechowy. Te bardzo aktywne cząsteczki uszkadzają nieosłonięte histonami DNA i prowadzą do zmian w materiale genetycznym. Powstawaniu zmian sprzyja dodatkowo niska wierność polimerazy replikującej mtDNA oraz mniej sprawne niż w jądrze komórkowym mechanizmy naprawcze w mitochondriach. Stąd niektóre regiony mtDNA ewoluują 5–10 razy szybciej niż geny jądrowego DNA występujące w pojedynczych kopiach. Największy stopień polimorfizmu obserwowany jest w obrębie tzw. regionu kontrolnego (pętli D, ang. D-loop) – jest to jedyny fragment mtDNA pozbawiony genów, który jest miejscem inicjacji transkrypcji [9]. Region kontrolny ma długość ok. 1100 pz, co stanowi mniej niż 7% całego genomu mitochondrialnego i obejmuje 2 regiony hiperzmiennie HV1 i HV2 (ryc. 1). Zwykle HV1 obejmuje fragment na odcinku od 16024 do 16365 pz, a HV2 od 73 do 340 pz. Przedstawiciele populacji afroamerykańskiej różnią się od siebie średnio w 14 pozycjach nukleotydowych, a przedstawiciele rasy kaukaskiej średnio w 8 pozycjach nukleotydowych w obszarze HV1/HV2. Czasami wyróżnia się także region HV3, który obejmuje obszar od 438 do 576 pz. W obrębie tego regionu, od 515 do 524 pz występuje polimorficzne dwunukleotydowe powtórzenie AC, które może mieć od 3 do 7 powtórzeń i można je



Ryc. 1. Sekwencje mitochondrialnego DNA wykorzystywane w badaniach kryminalistycznych. Zaznaczono wysoce polimorficzne regiony HV1, HV2 i HV3 (kolor niebieski) w obszarze niekodującym, w obrębie HV3 wyróżniono (kolorem jasnoniebieskim) dwunukleotydowe powtórzenie AC₍₃₋₇₎. W regionie kodującym (kolor pomarańczowy) żółtym kolorem wyróżniono gen kodujący cytochrom b. Miejsca SNP występują licznie i są rozsięte wzdłuż całej cząsteczki mtDNA, dlatego oznaczono jedynie przykładowy zestaw 11 miejsc SNP (czerwone strzałki) [12], wykorzystywany do rozróżniania haplotypów w obrębie subhaplogrupy H1 (wyjaśnienie w tekście)

Fig. 1. Mitochondrial DNA sequences used in forensic analysis. Highly polymorphic HV1, HV2 and HV3 regions from D-loop (non-coding region) are indicated with blue colour. Within HV3 region dinucleotide repeat of AC₍₃₋₇₎ is indicated with a pale-blue colour. Shown also cytochrome b gene (yellow) within the coding region (orange). Since SNP sites are dispersed throughout the whole mitochondrial genome, only 11 SNP sites are shown (red arrows), a panel that enables specifically to distinguish between haplotypes within sub-haplogroup H1 [12] (please find explanation in the text below)

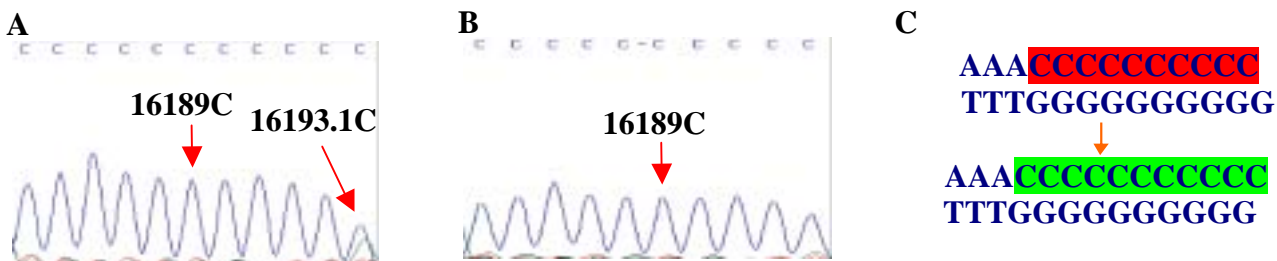
uznać za mitochondrialny odpowiednik sekwencji STR (ang. short tandem repeat) [12].

Po raz pierwszy cały genom mitochondrialny (nić lekka) został zse-

kwencjonowany przez Andersona i współpracowników w 1981 r. [2]. Sekwencja ta nazwana Sekwencją Referencyjną z Cambridge – CRS (ang. Cambridge Reference Sequence), stanowi standard, do którego odnosi się wszystkie nowo zsekwencjonowane haplotypy, wymieniając jedynie pozycję nukleotydu/ów, którym/i różnią się od Sekwencji Referencyjnej, a także rodzaj polimorfizmu (insercja, delecja, substytucja). Pozycja nukleotydowa nr 1 (w łańcuchu ciężkim) CRS, od której rozpoczyna się numerowanie została przyjęta arbitralnie. W 1999 r. Andrews i wsp. [3] wprowadzili poprawki do CRS i obecnie obowiązuje Poprawiona Sekwencja Referencyjna z Cambridge (ang. Revised Cambridge Reference Sequence).

Zjawisko heteroplazmii

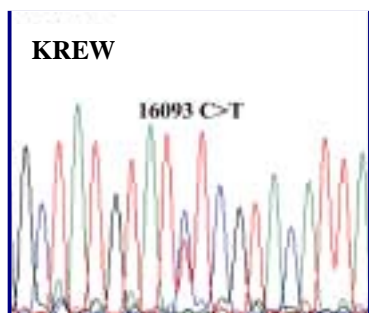
Populacja cząsteczek mtDNA występujących u jednego osobnika zwykle jest jednorodna, tzn. ma taką samą sekwencję, występuje wtedy homoplazmia. Można jednak napotkać zjawisko heteroplazmii, czyli występowania cząsteczek mtDNA o różnej sekwencji w jednym organizmie, wynikające z już wyżej wspomnianej wyższej częstości mutacji i ich kumulowania się ze względu na niedoskonałe mechanizmy naprawcze. Heteroplazmia może być dwojakiego rodzaju: może polegać na punktowej substytucji (zamianie jednego nukleotydu na inny, np. T na C; ryc. 3). Może polegać również na zmiennej długości ciągów jednego nukleotydu, głównie cytozyny (tzw. heteroplazmia długości) (por. ryc. 2 A, B, C).



Ryc. 2. A – Heteroplazmia długości w pojedynczym włosie polegająca na insercji dodatkowej cytozyny w pozycji 16193.1. W analizowanym włosie obecne są cząsteczki mtDNA o sekwencji identycznej z sekwencją mtDNA w innych tkankach i cząsteczki zawierające insercję. B – sekwencja mtDNA z krwi obwodowej. C – Schemat powstawania mutacji prowadzących do heteroplazmii długości traktów C (10C versus 11C)

Fig. 2. A – Length heteroplasmia in a single hair due to additional cytosine insertion in position 16193.1. In the sample there are both mtDNA sequences with insertion, as well as sequences identical to those found in other tissues. B – mtDNA sequence from blood. C – Example of mutation leading to length heteroplasmia of C-tracts (10C versus 11C)

Druga z wymienionych postaci heteroplazmii jest częstsza, a za jej przy-



Ryc. 3. Fragment elektroferogramu pokazujący heteroplazmię punktową w regionie HV1. W analizowanym materiale (krew) współwystępują zarówno cząsteczki z cytozyną w pozycji 16093, jak i cząsteczki z tyminą w tej samej pozycji

Fig. 3. Partial sequencing electropherogram showing point heteroplasmy in HV1 region. In the analysed material (blood) there are both mtDNA sequences with cytosine in position 16093, as well as with thymine in the same position

czynę uważa się zjawisko ślizgania się polimerazy replikującej mtDNA. Heteroplazmia długości dotyczy najczęściej obszarów między nukleotydami 16184-16193 w HV1 i 303-310 w HV2. Heteroplazmia może występować na kilku poziomach [4]:

- na poziomie organelli (mitochondrium),
- na poziomie komórki,
- na poziomie tkanki.

Heteroplazmię obserwuje się najczęściej we włosach, ze względu na niewielką liczbę komórek macierzystych, z których powstaje włos, co warunkuje jego klonalny charakter. Dlatego między włosami jednego człowieka mogą istnieć wyraźne różnice w mtDNA.

Bendall i wsp. [6] opisali zmienne poziomy heteroplazmii w trzonach różnych włosów pochodzących od tego samego człowieka. W organizmie w jednej tkance może występować 1 rodzaj mtDNA (homoplazmia), a w innej tkance różne rodzaje mtDNA, np. Sullivan [24] stwierdził punktową heteroplazmię u 5 spośród 12 włosów (pochodzących od tego samego dawcy) i homoplazmię we krwi.

W organizmie w jednej tkance może występować wiele rodzajów mtDNA (heteroplazmia), a w innej tkance także różne rodzaje mtDNA, np. Wilson [28] u jednej z badanych rodzin

stwierdził występowanie heteroplazmatycznej substytucji we krwi, a także we włosach telogenowych. Ostatni z wymienionych rodzajów heteroplazmii spotykany jest najrzadziej.

Heteroplazmia w obszarze HV1 lub HV2, polegająca na substytucji dotyczy zwykle 1 pz, zamiany nukleotydów w dwóch lub trzech miejscach występują ze znacznie mniejszą częstością. Może ona teoretycznie wystąpić w dowolnej pozycji sekwencji, jednak wyróżnia się tzw. gorące miejsca, gdzie heteroplazmia pojawia się z większą częstością [9]. Za takie miejsce uznawana jest m.in. pozycja 16093 w regionie HV1 [20] zaznaczona na ryc. 3. Wg Huhne'a [16] za heteroplazmię uznaje się sytuację, w której wysokość drugiego piku (reprezentującego dany nukleotyd na elektroferogramie) przekracza 40% (inne źródła podają 25%) [20] wysokości piku głównego, co oznacza, że stosunek dwóch sekwencji musi być jak 1:2,5 (ewentualnie 1:4). Występowanie heteroplazmii komplikuje interpretację sekwencjonowania obszarów HV1 i HV2, jednak nie dyskwalifikuje wykorzystania analizy mtDNA jako dowodu w sądzie. Ponadto zdarza się, że występowanie charakterystycznej heteroplazmii w dwóch analizowanych i porównywanych próbkach może zwiększyć siłę dowodu w sądzie.

Metodyka badawcza

Techniki stosowane przy analizie mtDNA nie odbiegają znacznie od technik stosowanych dla innych układów polimorficznych. Ponieważ podstawową metodą analizy mtDNA jest niezwykle czuła reakcja sekwencjonowania, polegająca na określaniu kolejności zasad w DNA, głównym zagrożeniem i problemem związanym z analizą mtDNA jest możliwość wystąpienia kontaminacji i jej monitorowanie. Aby zapobiec artefaktom wynikającym z zanieczyszczenia matrycy do reakcji sekwencjonowania stosuje się szczególne środki ostrożności, m.in. sekwencjonowaniu poddaje się fragmenty z obu nici mtDNA, a reakcję, jeśli to możliwe, przepro-

wadza się dwukrotnie. Konieczne jest stosowanie kontroli negatywnych i pozytywnych procesu ekstrakcji i amplifikacji, które pozwalają na monitorowanie zanieczyszczeń. Mimo to czasem, podczas analizy mtDNA, obserwuje się niski poziom zanieczyszczenia egzogennym DNA, jednak jest to dopuszczalne, ponieważ nadal możliwe jest uzyskanie prawidłowych wyników [4]. Badania prowadzone nad mieszaninami wykazały, że jeśli domieszka egzogennego DNA stanowi mniej niż 10% badanej próbki, wówczas nie wpłynie negatywnie na interpretację wyniku [27].

Materiały, z których najczęściej izoluje się mtDNA, to wspomniane już włosy, kości i zęby. Pozytywne wyniki badań uzyskuje się z fragmentu włosa o długości 1–2 cm, a niektóre laboratoria donoszą, że wystarczy nawet 3 mm włosa, jednak zawsze uzależnione jest to od jego średnicy i stanu [20].

Pierwszym, bardzo ważnym etapem badań jest oczyszczanie próbek. Włosy myje się w detergenie/etanolu, a następnie w wodzie, a także stosuje się wstępny etap trawienia proteinazą w celu usunięcia zewnętrznych zanieczyszczeń. W przypadku kości i zębów dodatkowo szlifuje się ich powierzchnię i poddaje promieniowaniu UV, a potem miazdzy na proszek.

Ekstrakcję DNA całkowitego z komórki przeprowadza się za pomocą standardowych procedur, jak metoda fenolowa czy izolacja przy użyciu cheleksu. Następnie wykorzystując specyficzne startery zaprojektowane dla regionów hiperzmiennych HV1 i HV2 (ewentualnie HV3) przeprowadza się reakcję amplifikacji. Przy standardowym podejściu na każdy hiperzmienny region przypada jedna para starterów (ryc. 4a). Najczęstsza kombinacja starterów to L15971/L15997 i H16401/H16410 dla HV1 oraz L15/L29 i H 408/H484 dla HV2. Liczba cykli wynosi od 30 do 62. Większość laboratoriów stosuje PCR bezpośredni, niektóre tzw. nested PCR. Ten ostatni polega na zastosowaniu 2 rodzajów starterów: pary zewnętrznej i wewnętrznej do po-

wielenia docelowego fragmentu. Do produktu powielonego za pomocą pierwszej pary starterów dodaje się kolejną parę starterów, których miejsca wiązania znajdują się na krańcach sekwencji docelowej powielonej w pierwszej reakcji – produkt tej drugiej reakcji amplifikacji jest krótszy. Metodę tę stosuje się, aby zwiększyć specyficzność reakcji i ilość otrzymanego produktu.

W przypadku podejrzenia, że mtDNA może być bardzo zdegradowane (fragmenty ok. 150 pz), do amplifikacji każdego z regionów hiperzmiennych stosuje się po 2 lub 4 (lub więcej – zależnie od spodziewanego stopnia degradacji) krótkie startery, które amplifikują fragmenty zachodzące na siebie (ryc. por. 4b i c). Wówczas uzyskiwane produkty amplifikacji mają odpowiednio po: 250 i 140 pz (lub 80 pz) 14. Podejście to stosowane jest do próbek kopalnego DNA.

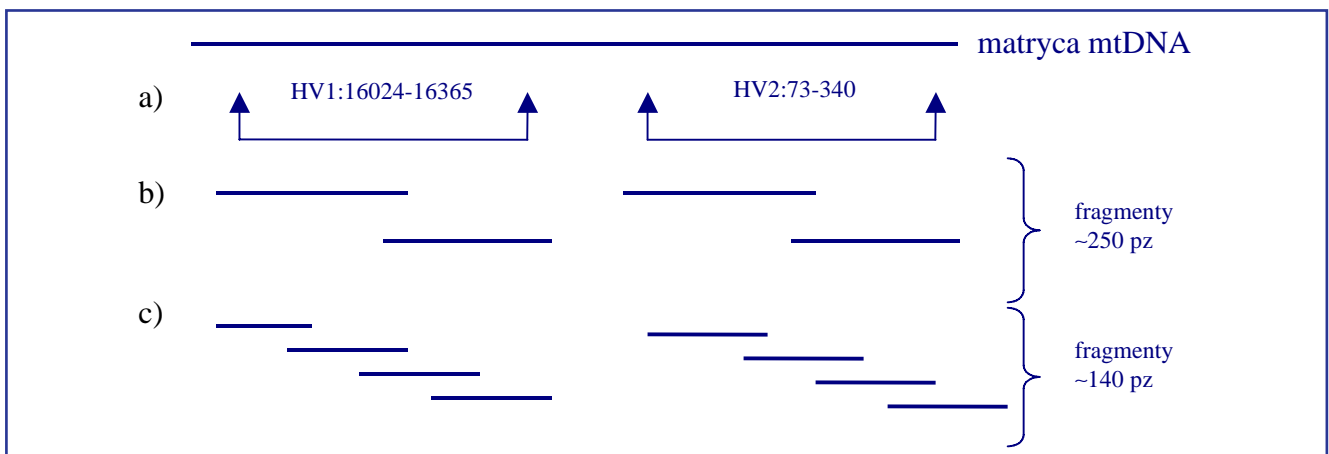
Jakość i ilość produktów reakcji PCR ocenia się na 1-procentowym

zmodyfikowanej metodzie opracowanej przez Fredericka Sangera w 1977 r. Polimeraza DNA wydłuża komplementarną do matrycy nić DNA o kolejne nukleotydy zaczynając od końca 3' startera. W mieszaninie reakcyjnej znajdują się oprócz „zwykłych” deoksynukleotydów, wyznakowane fluorescencyjnie dideoksynukleotydy (każdy innym barwnikiem), które są pozbawione grupy 3'OH. Przyłączenie się dideoksynukleotydu uniemożliwia wytworzenie wiązania fosfodiesterowego z kolejnym nukleotydem i tym samym dalsze wydłużanie. W trakcie reakcji sekwencjonowania powstaje populacja fragmentów o różnej długości (różniących się o jedną parę zasad) zakończonych wyznakowanymi dideoksynukleotydami, odpowiednio A, C, G lub T. Po oczyszczeniu produktów reakcji sekwencjonowania poddaje się je rozdzielaniu elektroforetycznemu na płytowym lub kapilarnym sekwenatorze, który porządkuje fragmenty pod względem ich długości. Wzbudzone

Interpretacja wyników

W przypadku gdy sekwencje mtDNA ze śladu biologicznego i materiału porównawczego pobranego od podejrzanego całkowicie pokrywają się, wówczas interpretujemy to jako zgodność lub że „nie można wykluczyć, iż pochodzą z tego samego źródła”. Wówczas należy podać, ile razy uzyskany haplotyp pojawia się w bazie sekwencji mtDNA osób niespokrewnionych.

Gdy sekwencje różnią się nieznacznie, wówczas należy sprawdzić, czy różnice te nie wynikają z heteroplazmii. W tym celu należy przeprowadzić szczegółową analizę, jeśli jest to możliwe, wielu próbek porównawczych np. krwi, nabłonka etc. Laboratorium FBI w Stanach Zjednoczonych analizuje w takich przypadkach do 5 dodatkowych próbek porównawczych [10]. Ze względu na częstą heteroplazmię włosów fragmenty włosów łączy się, tworząc 1 wspólną próbkę, z której izoluje się



Ryc. 4. Rysunek obrazujący trzy różne sposoby zaprojektowania reakcji amplifikacji regionów HV1/HV2 w zależności od spodziewanego stopnia degradacji DNA mitochondrialnego; a) tradycyjna amplifikacja, w której z regionu HV1 i HV2 powstaje po jednym produkcie; b) po użyciu 2 par starterów do każdego z regionów HV1/HV2, powstają po dwa produkty; c) po użyciu 4 par starterów do każdego z regionów HV1/HV2, powstają po cztery produkty

Fig. 4. Three different strategies of HV1/HV2 regions' amplification depending on the estimated mtDNA degradation state; a) standard strategy produces one product from each region; b) application of 2 primer pairs for both HV1 and HV2 results in two products for each one; c) application of 4 primer pairs for both HV1 and HV2 results in four products for each one

żelu agarozowym, a następnie poddaje się je oczyszczeniu, aby pozbyć się starterów. Kolejno przeprowadza się reakcję sekwencjonowania amplifikowanych regionów hiperzmiennych, z reguły z użyciem takich samych starterów, jak do reakcji PCR. Sekwencjonowanie opiera się na

światłem laserowym fluorescencyjne barwniki emitują promieniowanie o czterech odmiennych długościach fali, co pozwala odróżnić od siebie odpowiednie nukleotydy: A, C, G i T. Ostatecznie uzyskujemy sekwencję analizowanych regionów w postaci chromatogramu (ryc. 2 A, B; 3).

materiał genetyczny. Jeśli porównywane sekwencje różnią się choć jednym nukleotydem i nie wynika to z heteroplazmii, wówczas wynik jest nierozstrzygający.

W przypadku heteroplazmii długości homopolimerycznych traktów nukleotydowych trudne jest jedno-

znaczące określenie liczby nukleotydów w takim ciągu, i dlatego do celów interpretacyjnych wcześniej zakłada się, że ciąg obejmuje określoną liczbę zasad.

Jeśli dwie porównywane sekwencje mtDNA wykazują taką samą heteroplazmię wówczas interpretujemy taki przypadek jako zgodność lub że „nie można wykluczyć, iż pochodzą z tego samego źródła”. Jeśli jedna z próbek jest homoplazmatyczna, a druga heteroplazmatyczna, ale jedna z sekwencji próbki heteroplazmatycznej jest taka sama jak sekwencji homoplazmatycznej, wówczas błędem byłoby orzeczenie wykluczenia. Jeśli obie próbki wydają się homoplazmatyczne, a różnią się nieznacznie (np. w jednej pozycji nukleotydowej), konieczna jest powtórna analiza [10].

Bazy sekwencji DNA mitochondrialnego

Na świecie istnieje kilka ogólnie dostępnych baz danych sekwencji mtDNA, m.in. populacyjna baza stworzona przez SWGDAM (Grupa Robocza ds. Metod Analizy DNA). Działa ona w oparciu o oprogramowanie MitoSearch, opracowane przez FBI, pozwalające na przeszukiwanie całego regionu kontrolnego mtDNA, identyfikację oraz obliczenie ile razy konkretna sekwencja pojawia się w bazie danych. Od 2001 r. FBI prowadzi Program Narodowej Bazy Danych DNA Osób Zaginionych (CODISmt). Celem projektu jest gromadzenie profili mitochondrialnego DNA niezidentyfikowanych szczątków ludzkich i dowodów rzeczowych przydatnych do ich identyfikacji, jak również materiału referencyjnego od krewnych (w linii matczynej) osób zaginionych [8]. Inna baza elektroniczna mtDNA (Group's mitochondrial DNA population database Project – EMPOP) powstała z inicjatywy EDNAP (Europejskiej Grupy Oznaczania Profili DNA). Dane napływają z laboratoriów kryminalistycznych z różnych państw. W 2003 roku przeprowadzono „test analizy DNA mitochondrialnego”, w którym wzięło udział 21 laboratoriów europejskich i 2 z konty-

mentu amerykańskiego. Celem projektu było stwierdzenie, czy laboratoria stosujące różne metody i strategie analizy uzyskują jednolite i zgodne wyniki, a także ocena źródeł możliwych błędów. Analiza projektu wykazała dużą zgodność co do uzyskiwanych wyników oraz znikomą liczbę błędów i posłużyła do opracowania wytycznych, w oparciu o które konstruowana jest baza mtDNA wysokiej jakości [2].

Bazy populacyjne umożliwiają porządkowanie haplotypów do określonych haplogrup, czyli zbiorów haplotypów charakteryzujących się wspólnymi polimorfizmami w obrębie całego genomu mitochondrialnego. Np. ok. 99% przebadanych haplotypów mtDNA dla rasy kaukaskiej (w Europie i Stanach Zjednoczonych) można zaklasyfikować do 10 głównych haplogrup: H, I, J, K, M, T, U, V, W i X. Najczęstszą haplogrupą jest grupa H, która wg danych SWGDAM występuje z częstością 45,7%. Kolejne często występujące haplogrupy to: U (15,6%), T (10,5%), J (10%), i K (8,9%) [9]. W obrębie haplogrup można dodatkowo wyróżnić subhaplogrupy, np. haplogrupę H można podzielić na 7 subhaplogrup: H1-H7. O przynależności do haplogrupy czy subhaplogrupy decyduje podobieństwo sekwencji haplotypów, które wskazuje na ich wspólne pochodzenie.

Największym problemem baz danych mtDNA jest jak na razie niewielka liczba zgromadzonych haplotypów, co może prowadzić do uzyskiwania zawyżonych wartości częstości danego haplotypu w populacji. W miarę napływania nowych haplotypów liczba sekwencji, które pojawiają się w bazie tylko raz będzie się zmniejszać. Stworzenie bazy obejmującej reprezentatywną i znaczącą grupę haplotypów dla danej populacji jest trudniejsze i wymaga większej liczby danych niż w przypadku markerów jądrowych. Struktura populacji mtDNA jest odmienna od populacji układów autosomalnych STR – charakteryzuje się mniej równomiernym rozkładem, co może wynikać ze wspomnianego już dziedziczenia odmatczynego, braku rekombinacji, czy tzw. efektu założyciela.

Zastosowanie

Analizę mtDNA po raz pierwszy wykorzystano w 1996 r. w postępowaniu sądowym w sprawie Paula Ware'a oskarżonego o dokonanie gwałtu i morderstwa 4-letniej dziewczynki [13]. Paul Ware – mieszkaniec stanu Tennessee (USA) i opiekun dziewczynki – został znaleziony nietrzeźwy obok ciała dziewczynki. Jedynymi śladami z miejsca zbrodni było kilka włosów znalezionych w łóżku i jeden ujawniony w krtani dziewczynki. Analiza porównawcza mitochondrialnego DNA z wybranych włosów i materiału porównawczego (ślina podejrzanego) wykazała zgodność sekwencji, natomiast sekwencja mitochondrialnego DNA z krwi ofiary była odmienna. W bazie danych mtDNA FBI (obejmującej wówczas 742 haplotypy) sekwencja mtDNA od Paula Ware'a nie wystąpiła ani razu. Oskarżony został uznany za winnego zarzucanego mu czynu.

Dziedziczenie odmatczyne i brak rekombinacji oznaczające, że krewni w linii matczynej mają taką samą sekwencję ułatwia identyfikację osób zaginionych bądź zwłok lub szczątków N.N., polegającą na porównaniu sekwencji mtDNA wyizolowanego ze śladów biologicznych z próbkami referencyjnymi od krewnych w linii matczynej.

Opracowanie metod analizy mtDNA stwarza szansę na rozwikłanie wielu aktualnie prowadzonych spraw kryminalnych, ale także tych, które w przeszłości nie doczekały się wyjaśnienia. Przykładem może być zaginięcie 61-letniego pacjenta w 1979 r. w USA, który oddalił się z ośrodka opieki medycznej dla weteranów [8]. Mimo intensywnych poszukiwań mężczyzny nie udało się odnaleźć. Ponad 10 lat później w pobliżu ośrodka pies przypadkowo wykopał czaszkę ludzką i sprawę przekazano do laboratorium FBI. W 1999 r. analiza mitochondrialnego DNA wykazała zgodność profilu uzyskanego z czaszki z sekwencją pochodzącą od brata zaginionego mężczyzny. Sprawę zamknięto, ogłaszając, iż odnalezione szczątki należą do zaginio-

nego pacjenta, i przekazano je rodzinie w celu pochówku.

W innym nierozstrzygniętym przypadku, dotyczącym morderstwa, badanie mtDNA dwóch włosów, których wcześniejsza analiza mikroskopowa sugerowała, że pochodzą od 1 osoby, wykazała, że w rzeczywistości pochodzą one od 2 różnych osób.

W kolejnej sprawie analiza mtDNA ze szczątków ludzkich (po porównaniu z profilem domniemanego rodzeństwa) wykluczyła pokrewieństwo, a tym samym zakładaną wcześniej tożsamość tych szczątków [8].

Technologię sekwencjonowania mtDNA wykorzystano już wielokrotnie m.in. do identyfikacji szczątków ciał ofiar wojny w Wietnamie [15], a także ofiar katastrof masowych takich, jak atak terrorystyczny na World Trade Center 11 września 2001 r. [7]. W tym ostatnim przypadku sekwencjonowanie mtDNA przeprowadziła firma Celera Genomics (znana z prac nad sekwencjonowaniem ludzkiego genomu).

Jeśli chodzi o rutynowe badania z wykorzystaniem mtDNA – stanowią one często ostatnią deskę ratun-

Ponadto analiza mtDNA stanowi cenne źródło informacji w badaniach antropologicznych i ewolucyjnych.

Po raz pierwszy kopalne mtDNA wyizolowano w 1977 r. ze szczątków człowieka neandertalskiego, odkrytych w jaskini Feldhofer w Niemczech [21]. W kolejnych latach podczas prac wykopaliskowych w jaskini Mezmaiskaya na Kaukazie zostały odkryte szczątki dziecka neandertalskiego. Z żebra wyizolowano mtDNA, a następnie zsekwencjonowano region HV1 przy użyciu specyficznych starterów. Porównanie uzyskanej sekwencji z CRS wykazało 22 substytucje i 1 insercję, podobne wyniki uzyskano przy porównaniu ze współczesnymi sekwencjami azjatyckimi i afrykańskimi, co sugerowało, że pochodzące od neandertalczyka sekwencje nie są „blisko spokrewnione” ze współczesnym mtDNA ludzkim i tworzą odrębną grupę. Z kolei przy porównaniu mtDNA pobranego ze szczątków z Mezmaiskaya i z Feldhofer stwierdzono jedynie 12 różnic (substytucji), co sugerowało, że sekwencje te są bliżej spokrewnione ze sobą niż ze współczesnymi sekwencjami mtDNA. Kolejny kopalny mtD-

kiego wynoszą średnio ok. 5 substytucji.

Analiza mtDNA została także wykorzystana do rozwiązania głośnej sprawy domniemanych szczątków cara Mikołaja II z dynastii Romanowów [17]. Odnalezione fragmenty kości liczące ponad 70 lat porównano z materiałem referencyjnym pobranym od żyjących potomków rodziny carskiej. Sekwencja uzyskana od Filipa, księcia Edynburga, była zgodna z sekwencją uzyskaną w trakcie analizy domniemanych szczątków carycy i jej dzieci. Podobnie sekwencje dwojga z żyjących krewnych cara Mikołaja wykazywały zgodność z sekwencją uzyskaną w trakcie analizy jego domniemanych szczątków, z wyjątkiem różnicy dotyczącej jednej zasady. Był to pierwszy odnotowany w medycynie sądowej przypadek heteroplazmii, ujawniony podczas analizy prowadzonej przez Forensic Science Service w Wielkiej Brytanii w 1994 r., co przy ówczesnym niewielkim zakresie wiedzy na temat zjawiska heteroplazmii zasiało wątpliwości co do wiarygodności uzyskanych wyników. Jednak niezależna analiza sekwencji mitochondrialnej



Ryc. 5. Typowe ślady biologiczne, z których izoluje się mtDNA. A. Kości czaszki ludzkiej wraz z zębami. B. Fragment kości przedramienia i fragmenty tkanki chrzęstnej, Fot. Andrzej Chmiel, C. Włos telogenowy. Zaznaczono trzon i korzeń. Zdjęcie mikroskopowe, powiększ. 20x, Fot. K. Gawęda-Walerych
Fig. 5. Standard materials used in mtDNA analysis. A. Human skull bones with teeth, B. Arm bone fragment with cartilage tissue fragments, Photo: Andrzej Chmiel, C. Telogen hair: root and hair shaft shown. Microscopic slide, magnification 20x, Photo: K. Gawęda-Walerych

ku podczas analizy śladów biologicznych, w których ze względu na wysoką degradację DNA jądrowego z powodu wieku lub specyficznego charakteru materiału, analiza układów STR zawodzi. Do materiałów takich należą włosy (telogenowe lub same trzony), a także zęby i kości (ryc. 5).

NA wyizolowany ze szczątków człowieka neandertalskiego w jaskini Vindija w Chorwacji różnił się w 6 pozycjach nukleotydowych (substytucje) od sekwencji mtDNA pobranego ze szczątków z Mezmaiskaya i Feldhofer, co wskazywało na jeszcze bliższe pokrewieństwo. Trzeba zaznaczyć, że różnice między sekwencjami współczesnego mtDNA ludz-

ze ekshumowanych szczątków brata cara – Georgija Romanowa, przeprowadzona w Armed Forces DNA Identification Laboratory w Stanach, wykazała występowanie takiej samej heteroplazmii, co rozwiało wątpliwości i potwierdziło hipotezę, że badane szczątki należą do cara Mikołaja II.

Analiza mtDNA odgrywa również rolę w medycynie klinicznej. Wyróż-

niono wiele chorób wywołanych mutacjami mtDNA. Dotykają one głównie tkanek nerwowej i mięśniowej, nerek i tkanki wytwarzającej hormony, których funkcjonowanie w dużym stopniu zależy od prawidłowo działających mitochondriów. Są to choroby dające bardzo heterogenne objawy, głównie neuropatologie (głuchota, ślepota) i miopatologie (degeneracja i paraliż mięśni, padaczki, ataksje). Zmiany w mitochondrialnym DNA mają związek również z niektórymi formami cukrzycy. Nadal toczy się dyskusja odnośnie do roli zmian w mtDNA w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona czy Alzheimerera.

Wykazano również, że występowanie określonych mutacji/polimorfizmów może być związane z większym bądź mniejszym ryzykiem zapadnięcia na daną chorobę, np. posiadanie haplotypu przynależącego do haplogrupy U zwiększa u mężczyzn ryzyko zapadnięcia na chorobę Alzheimerera w porównaniu z najbardziej popularną haplogrupą H. Tymczasem przynależność do tej samej haplogrupy u kobiet związana jest ze zmniejszeniem ryzyka zachorowania [26]. Mitochondria wiążą się również z procesem starzenia, który wg mitochondrialnej teorii starzenia wynika z akumulacji uszkodzeń w tych organellach w trakcie życia osobniczego prowadząc do osłabienia i upośledzenia funkcji organizmu.

Ostatnio zyskuje na znaczeniu analiza mtDNA ze śladów pochodzenia zwierzęcego (głównie sierści zwierząt domowych), gdyż umożliwia określenie ich przynależności gatunkowej. Metoda ta jest przydatna w przypadku: nielegalnego handlu produktami pochodzącymi od zwierząt zagrożonych wyginięciem, kłusownictwem czy wypadkami drogowymi, w których uczestniczą zwierzęta. Do określenia przynależności gatunkowej wykorzystywany jest gen kodujący cytochrom b (ryc. 1) [23]. Sekwencja nukleotydowa tego genu jest specyficzna dla danego gatunku. Jedna para starterów komplementarnych do konserwatywnych regionów flankujących gen cytochromu b po-

zwala na amplifikowanie tego genu z materiału pochodzącego od różnych gatunków zwierząt. Produkt reakcji jest sekwencjonowany, a uzyskaną sekwencję porównuje się z wartością bazy nukleotydowej, np. GenBank [29], która obejmuje znane sekwencje mtDNA, z wykorzystaniem narzędzia internetowego BLAST [30]. Metoda ta umożliwiła wykazanie, że np. sprzedawcy produktów używanych w chińskiej medycynie tradycyjnej często oszukują i zamiast kości tygrysa czy rogu nosorożca klient nabywa produkt, który w rzeczywistości pochodzi od krowy lub świni [19].

Zwiększanie siły dyskryminacji analizy mitochondrialnego DNA – poszukiwanie nowych metod i markerów

Badania populacyjne wykazały, że rozkład częstości haplotypów mtDNA jest nierównomierny: np. ponad 50% populacji kaukaskiej charakteryzuje się unikatowym haplotypem HV1/HV2 (pojawiającym się 1 raz w bazie danych), podczas gdy najczęstszy haplotyp HV1/HV2 występuje u ok. 7% populacji. I właśnie u tych 7% najbardziej manifestuje się niska wartość siły dyskryminacji [12]. Oznacza to, że jeśli przeprowadzamy standardowe sekwencjonowanie jedynie regionów HV1/HV2, wówczas może się zdarzyć, że haplotypy HV1/HV2 podejrzanego i ofiary są identyczne. Budowie i wsp. [11] obliczyli, że prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności (ang. Random Match Probability) dla regionów HV1/HV2 wynosi ok. 0,005–0,025. Dlatego ostatnio wiele wysiłku poświęca się na opracowanie metod, które pozwoliłyby na rozróżnianie osób mających taki sam haplotyp HV1/HV2. Sekwencjonowanie całej cząsteczki mtDNA na pewno rozwiązałoby powyższy problem, gdyż niezmiernie rzadko zdarza się, żeby dwie osoby miały identyczną sekwencję mtDNA, jednak jest to bardzo czasochłonne i kosztowne. Dal- sze różnicowanie śladów przez analizę regionu HV3 również może być

nierozstrzygające. Dużą nadzieję pokłada się w analizie dodatkowych markerów SNP (ang. single nucleotide polymorphism – polimorfizm pojedynczego nukleotydu). Powstawanie SNP wynika z mutacji punktowych prowadzących do zamiany pojedynczych nukleotydów na inne w sekwencji DNA. Wyniki sekwencjonowania całego genomu mitochondrialnego ujawniły występowanie wielu miejsc SNP, które mogą pomóc w sklasyfikowaniu badanych próbek do jednej z haplogrup (określone SNP decydują o przynależności do konkretnej haplogrupy, a w rezultacie do subhaplogrupy).

Coble i wsp. [12] na podstawie zsekwencjonowania całej cząsteczki mtDNA u 241 osób wyróżnili 209 różnych haplotypów, wśród nich 18 haplotypów HV1/HV2. Haplotypy te wchodziły w skład 5 haplogrup rasy kaukaskiej: H, J, T, V i K. Klasyfikacja ta umożliwiła znalezienie takiej kombinacji miejsc SNP, która byłaby szczególnie przydatna w praktyce kryminalistycznej i posłużyłaby do stworzenia zestawów pozwalających na rozróżnienie, w trakcie 1 reakcji multipleksowej, takich samych haplotypów HV1/HV2 w obrębie konkretnej haplogrupy lub subhaplogrupy. Kierowano się następującymi kryteriami:

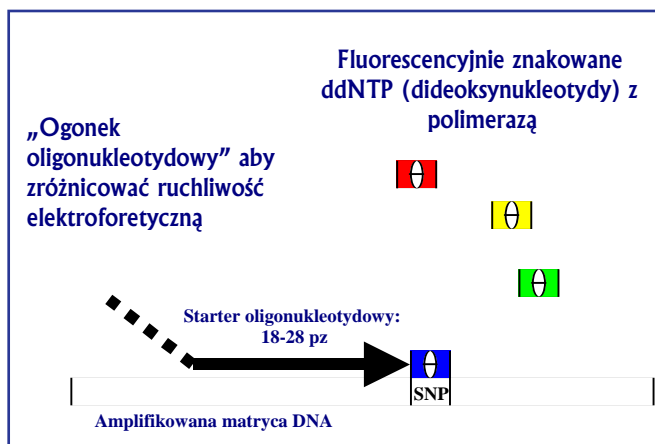
1. Wybrane miejsca SNP powinny być neutralne z punktu widzenia chorób genetycznych (ogólnie fenotypu);
2. Wybrane miejsca SNP powinny charakteryzować się dużą zmiennością w populacji;
3. Wybrane miejsca SNP powinny się wzajemnie uzupełniać (w kwestii siły dyskryminacji), tak, aby jak najmniejsza liczba miejsc SNP dawała najwyższe wartości siły dyskryminacji. Kierując się powyższymi kryteriami badacze wybrali miejsca SNP zarówno z regionu kontrolnego (poza obszarem HV1/HV2), jak i regionu kodującego i połączyli je w grupy po 7–11 miejsc. Na ryc. 1 zaznaczono jeden z takich zestawów, obejmujący 11 miejsc SNP do specyficznego rozróżniania haplotypów w obrębie subhaplogrupy H1. Skonstruowane w powyższy sposób zestawy multipleksowe markerów SNP pozwalają

na szybkie „przeszukiwanie sekwencji” mtDNA w celu zawężenia kręgu podejrzanych lub liczby śladów wybieranych do dalszej analizy (sekwencjonowania), gdy konkretna sprawa obejmuje dużą liczbę dowodów rzeczowych. W ciągu ostatnich lat powstały nowe metody analizy markerów SNP: SSCP, mikromaciecze DNA, dyskryminacja alleliczna przy użyciu reakcji PCR w czasie rzeczywistym (real time PCR), czy reakcja minisekwencjonowania. Ostatnia z wymienionych metod jest z powodzeniem stosowana i polega na wykonaniu multipleksowej reakcji PCR, w której starter jest tak zaprojektowany, że hybryduje (przyłącza się) bezpośrednio tuż przy badanym miejscu SNP, a następnie jest wydłużany o 1 nukleotyd przez fluorescencyjnie wyznakowany dideoksynukleotyd (ryc. 6). Dodanie dideoksynukleotydu uniemożliwia dalsze wydłużanie łańcucha DNA przez polimerazę. Wyznakowane fluorescencyjnie produkty amplifikacji są następnie rozdzielane i wizualizowane na sekwenatorze. Na rynku dostępne są komercyjne zestawy np. SNaPshot (Applied Biosystems) pozwalające na jednoczesną analizę 10 markerów SNP lub zestawy multipleksowe opracowane przez laboratoria kryminalistyczne obejmujące 17 SNP.

Podsumowanie

Od początku lat 90. analiza mitochondrialnego DNA stanowi cenne narzędzie wykorzystywane w badaniach kryminalistycznych. Pozwala ona na uzyskanie wyników z materiałów zniszczonych działaniem czasu, czynników fizycznych i biologicznych, próbek bardzo zdegradowanych takich, jak zwęglone szczątki ludzkie

i zwierzęce, włosy, kości, zęby, itp. Obecnie następuje szybki rozwój technik, które umożliwią analizę mtDNA na szerszą skalę. Oprócz standardowej analizy – sekwencjonowania regionów HV1/HV2 i HV3, dodatkowa analiza wybranych przez badaczy markerów SNP obecnych w całej cząsteczce pozwoli na zwiększenie siły dyskryminacji, a tym samym większą przydatność i znaczenie analizy mtDNA w kryminalistyce. Poszerzenie baz danych mtDNA o nowe profile pozwoli na precyzyjniejsze opracowanie statystyczne uzyskiwanych wyników.



Ryc. 6. Metoda minisekwencjonowania: detekcja SNP w regionie kodującym mtDNA. Starter SNP jest wydłużany o jedną parę zasad [25].

Fig. 6. Minisequencing method: SNP detection within mtDNA coding region. Specific SNP primer is elongated with one fluorescently labeled base. [25].

W mitochondrialnym DNA tkwi duży potencjał, a możliwości zastosowań obejmują coraz więcej dziedzin. Należy jednak również pamiętać o ograniczeniach, jakie narzuca specyfika analizy mitochondrialnego DNA, związana ze sposobem dziedziczenia oraz strukturą populacji.

BIBLIOGRAFIA

1. **Alberts B.:** Molecular biology of the cell, the genomes of mitochondria and chloroplasts, 1994, s. 704–717.
2. **Anderson S., Bankier A., Barrell B., de Bruijn M., Coulson A., Drouin J., Eperon I., Nierlich D., Roe B., Sanger F., Schreier P., Smith A., Staden R., Young I.:** Sequence and organization of the human mitochondrial genome, „Nature” 1981, nr 290, s. 457–65.

3. **Andrews R., Kubacka I., Chinnery P., Lightowlers R., Turnbull D., Howell N.:** Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA, „Nat. Genet.” 1999, nr 23, s. 147.

4. **Bar W., Brinkmann B., Budowle B., Carracedo A., Gill P., Holland M., Lincoln P.J., Mayr W., Morling N., Olausen B., Schneider P.M., Tully G., Wilson M.:** DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing, „Int. J. Legal. Med.” 2000, nr 113, s. 193–6.

5. **Bartnik E.:** Choroby dziedziczne II. Defekt genomu mitochondrialnego. W: *Biologia molekularna w medycynie, Elementy genetyki klinicznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001, s. 149–156.

6. **Bendall K.E., Macaulay V.A., Sykes B.C.:** Variable levels of a heteroplasmic point mutation in individual hair roots, „Am. J. Hum. Genet.” 1997, nr 61, s. 1303–8.

7. **Brenner C.H., Weir B.S.:** Issues and strategies in the DNA identification of World Trade Center victims, „Theor. Popul. Biol.” 2003, nr 63, s. 173–8.

8. **Bridgeford A.N., Wrxall B.G.D.:** Mitochondrial DNA analysis: casework examples and database compilation, California Association of Criminalists 97th Semi-annual Seminar, 2001.

9. **Budowle B., Allard M., Wilson M., Chakraborty R.:** Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations, „Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.” 2003, nr 4, s. 119–41.

10. **Budowle B., DiZinno J.A., Wilson M.R.:** Interpretation guidelines for mitochondrial DNA sequencing, www.promega.com/geneticidproc/ussymp10-proc/content/37Budowle.pdf

11. **Budowle B., Wilson M., DiZinno J., Stauffer C., Fasano M., Holland M., Monson K.:** Mitochondrial DNA regions HVI and HVII population data, „Forensic Science International” 1999, nr 103, s. 23–35.

12. **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 foren-

sic testing in Caucasians, „Int. J. Legal Med.” 2004, nr 118, s. 137–46.

13. **Davis C.L.:** Mitochondrial DNA: State of Tennessee v. Paul Ware „Profiles in DNA” 1998, nr 103, s. 6–7, http://www.promega.com/profiles/103/103_06.html.

14. **Gabriel M.N., Huffine E.F., Ryan J.H., Holland M.M., Parsons T.J.:** Improved mtDNA sequence analysis of forensic remains using a „mini-primer set” amplification strategy, „J. Forensic Sci.” 2001, nr 46, s. 247–53.

15. **Holland M.M., Fisher D.L., Mitchell L.G., Rodriquez W.C., Canik J.J., Merrill C.R., Weedn V.W.:** Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam War, „J. Forensic Sci.” 1993, nr 38, s. 542–53.

16. **Huhne J., Pfeiffer H., Waterkamp K., Brinkmann K.:** Mitochondrial DNA in human hair shafts-existence of intra-individual differences?, „Int. J. Legal Med.” 1999, nr 112, s. 172–5.

17. **Ivanov P.L., Wadhams M.J., Roby R.K., Holland M.M., Weedn V.W., Parsons T.J.:** 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, nr 12, s. 417–20.

18. **Isenberg A., Moore J.:** Mitochondrial DNA analysis at the FBI laboratory, „Forensic Science Communications” 1999, nr 1, <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july1999/dnalist.htm>

19. **Jobling M.A., Gill P.:** Encoded evidence: DNA in forensic analysis, „Nat. Rev. Genet.” 2004, nr 5, s. 739–51.

20. **Melton T., Nelson K.:** Forensic mitochondrial DNA analysis: two years of commercial casework experience in the United States, „Croat. Med. J.” 2001, nr 42, s. 298–303.

21. **Ovchinnikov I., Goodwin W.:** The Isolation and Identification of Neanderthal Mitochondrial DNA „Profiles in DNA” 2000, nr 402, s. 9–11, http://www.promega.com/profiles/402/402_09.html.

22. **Parson W., Brandstatter A., Alonso A., Brandt N., Brinkmann B., Carracedo A., Corach D., Froment O., Furac I., Grzybowski T., Hedberg K., Keyser-Tracqui C., Kupiec T., Lutz-Bonengel S., Mevag B., Ploski R., Schmitter H., Schneider P., Syndercombe-Court D., Sorensen E., Thew H., Tully**

G., Scheithauer R.: The EDNAP mitochondrial DNA population database (EMPOP) collaborative exercises: organisation, results and perspectives, „Forensic Sci. Int.” 2004, nr 139, s. 215–26.

23. **Parson W., Pegoraro K., Niederstatter H., Foger M., Steinlechner M.:** Species identification by means of the cytochrome b gene, „Int. J. Legal Med.” 2000, nr 114, s. 23–8.

24. **Sullivan K., Alliston-Greiner R., Archampong F., Piercy R., Tully G., Gill P., Lloyd-Davies C.:** A single difference in mtDNA control region sequence observed between hairshaft and reference samples from a single donor, „Proceeding from the seventh international symposium on human identification”, Promega, Madison, 1996, s. 126–130.

25. **Vallone P., Coble M., Letmanyi I., Parsons T., Butler J.:** Multiplex Detection of 10 SNPs Located in the coding region of the mitochondrial genome, http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/pub_pres/ValloneASHGposter2002.pdf

26. **Van der Walt J.M., Dementieva Y.A., Martin E.R., Scott W.K., Nicodemus K.K., Kroner C.C., Welsh-Bohmer K.A., Saunders A.M., Roses A.D., Small G.W., Schmechel D.E., Murali Doraiswamy P., Gilbert J.R., Haines J.L., Vance J.M., Pericak-Vance M.A.:** Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk, „Neurosci. Lett.” 2004, nr 365, s. 28–32.

27. **Wilson M., Polanskey D., Butler J., DiZinno J., Replogle J., Budowle B.:** Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts, „Biotechniques” 1995, nr 18, s. 662–9.

28. **Wilson M.R., Polanskey D., Replogle J., DiZinno J.A., Budowle B.:** A family exhibiting heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region reveals both somatic mosaicism and pronounced segregation of mitotypes, „Hum. Genet.” 1997, nr 100, s. 167–71.

29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>.

30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>.

**W Bibliotece CLK KGP
można skorzystać
z następujących czasopism zagranicznych**

Archiv für Kryminologie
Computers and Security
Fingerprint Whorld
Forensic Science International
Forensic Science Review
Foto Magazin
Guns and Ammo
International Journal of Legal Medicine
Internationales Waffen-Magazin – Visier
International Defense Review
Journal of Forensic Identification
Journal of Forensic Sciences
Kriminalistik
Masterruzhie
Science and Justice
Verkehrsunfall und Fahrzeugtechnik
Wirtschaftsschutz und Sicherheitstechnik
Biblioteka czynna jest codziennie
w godz. 8.15–12.15, tel. 601-45-30