

**Доклад на тему : МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ  
В РУКАХ ДЕТЕКТИВА, ИЛИ ОПЫТ ИССЛЕДОВАНИЯ  
ОСТАНКОВ СЕМЬИ ПОСЛЕДНЕГО РОССИЙСКОГО  
ИМПЕРАТОРА**

**Подготовила : ГРЕБНЕВА А.Е ИЛП-211**

# НАЗНАЧЕНИЕ ЭКСПЕРТИЗЫ И ЕЕ ЗАДАЧИ

- В 1991 году в окрестностях Екатеринбурга было обнаружено групповое захоронение людей со следами насильственной смерти. По некоторым данным, это могло быть захоронение семьи и членов ближайшего окружения последнего российского императора, расстрелянных по приказу Уралсовета осенью 1918 г. Было известно, что в Екатеринбурге находилось 7 членов царской семьи: император Николай Александрович, императрица Александра Федоровна, их сын царевич Алексей и четыре дочери - царевны Ольга, Татьяна, Мария и Анастасия. После расстрела трупы были обезображены, убитых вывезли на грузовике и тайно захоронили. Установление принадлежности найденных останков членам царской семьи могло пролить свет на тайну гибели императора и его семьи.
- По факту обнаружения останков группы убитых Генеральной прокуратурой и Бюро Главной судебно-медицинской экспертизы РФ была назначена комплексная экспертиза, призванная ответить на следующие вопросы. Какова половая принадлежность захороненных лиц? Есть ли в группе останки родственников и в какой степени родства были эти люди? Соотносятся ли останки по каким-либо признакам с ныне здравствующими родственниками царской семьи?
- Комиссия включала представителей многих областей наук. В порядке эксперимента в комиссию такого рода был впервые включен специалист по молекулярной генетике - молодой, но уже известный ученый Павел Леонидович Иванов. Исследование останков традиционными антропологическими методами показало, что было захоронено 9 человек. Семь из них могли быть членами царской семьи.



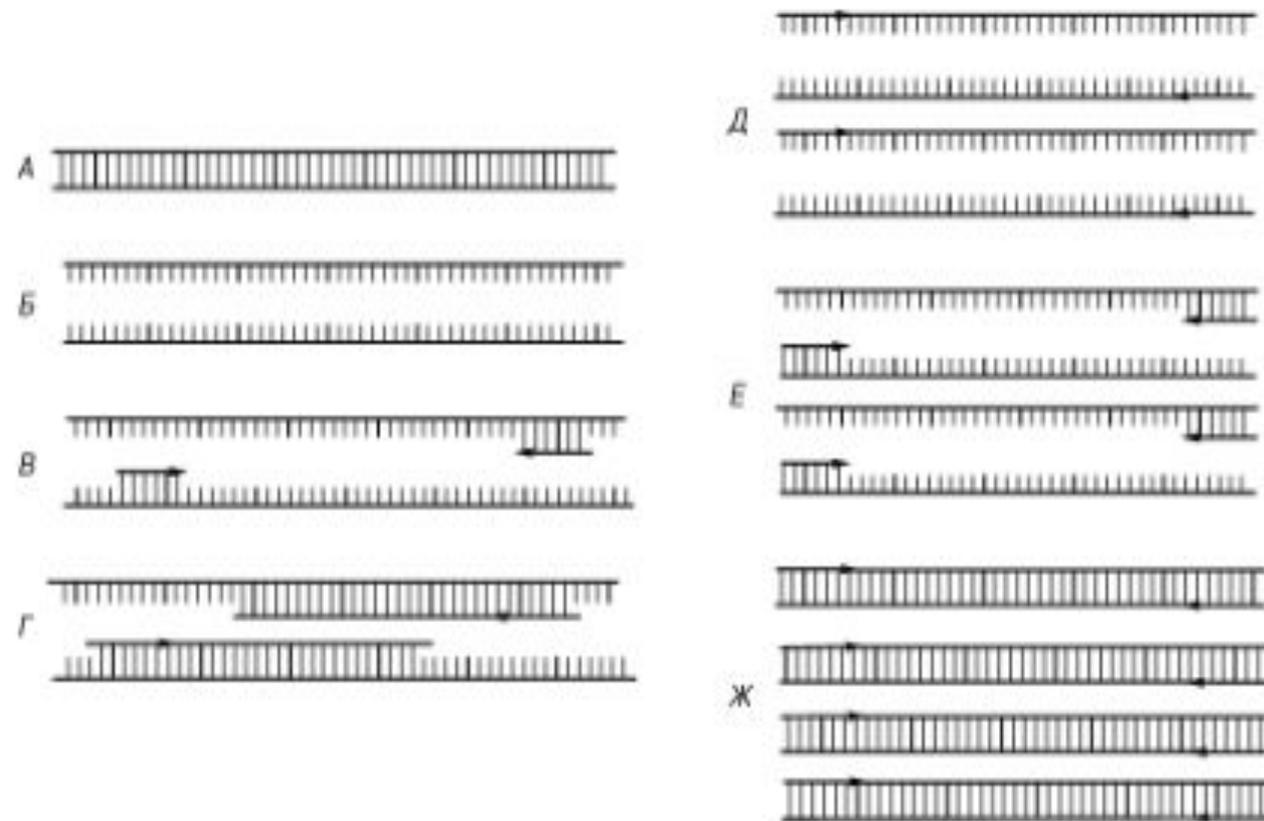
# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА ИНДИВИДОВ ПО АНАЛИЗУ ГЕНА АМЕЛОГЕНИНА

- На первом этапе исследования определяли пол людей, чьи останки находились в Екатеринбургском захоронении. Из костных останков 9 человек были получены препараты ДНК. Хотя методы выделения ДНК из различных тканей хорошо отработаны и даже известен случай получения ДНК из мумии фараона, задача была непростой. Скелеты пролежали в земле 73 года и сохранились не так хорошо, как в саркофаге. Несмотря на это, из костей все же удалось выделить ДНК, правда, в количествах, измеряемых миллиардными долями грамма (около 20 пикограммов). Тем не менее этого количества ДНК достаточно для анализа, так как оно на порядок превышает суммарный вес ДНК в одной клетке человека.



- Определение половой принадлежности по ДНК основано на том, что половые хромосомы X и Y несут гомологичный ген, который находится в них в разных аллельных состояниях - ген в Y-хромосоме на 6 пар нуклеотидов длиннее, чем в X-хромосоме. Этот ген кодирует компонент зубной эмали амелогенин.
- Для того чтобы выявить, содержится ли в данном образце ДНК Y-хромосома (то есть образец принадлежит мужчине), из всей геномной ДНК анализируют лишь область амелогенинового гена, содержащую участок, различный в X- и Y-хромосомах. Размер этой области составляет одну тридцатимиллионную часть от всего генома человека. Для этого накапливают нужный фрагмент в количествах, доступных для анализа, при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР позволят получить большие количества изучаемого фрагмента ДНК даже в том случае, если в распоряжении исследователя имеется всего лишь одна исходная молекула геномной ДНК.





**Рис. 1.** Схема полимеразной цепной реакции.

А, Б – исходную молекулу ДНК прогревают, чтобы разрушить водородные связи, соединяющие комплементарные нити; В – реакционную смесь охлаждают в присутствии двух коротких (12 – 20 пар нуклеотидов) фрагментов ДНК, один из которых комплементарен участку нити слева от изучаемого локуса, а второй комплементарен участку другой нити справа от локуса. Эти фрагменты, называемые праймерами, связываются с соответствующими участками ДНК; Г – связавшиеся с нитью ДНК праймеры задают точку начала синтеза новой комплементарной нити на матрице ДНК. Осуществляет этот синтез фермент ДНК-полимераза; Д – раствор с полученными копиями ДНК снова прогревают; Е, Ж – в следующем цикле вновь синтезированные нити ДНК используются в качестве матрицы. Новая порция праймеров связывается с соответствующими участками, и происходит новый цикл синтеза. В живой клетке ДНК-полимераза осуществляет репликацию ДНК при делении клетки, то есть полностью воспроизводит геномную ДНК. При проведении ПЦР синтезируется только небольшой фрагмент, расположенный между праймерами. За 30 циклов количество синтезированных фрагментов составит около 1 миллиарда.



- На рис. 2 показаны результаты разделения фрагментов гена амелогенина после проведения ПЦР на ДНК из костных останков. На девяти дорожках справа - фрагменты, полученные на ДНК из костных останков. Слева - две дорожки с контрольными образцами: фрагментами, синтезированными на геномной ДНК, выделенной из крови мужчины и женщины. У мужчин образуется два фрагмента: длиной 112 пар нуклеотидов, соответствующий Y-хромосоме, и 106 пар нуклеотидов, соответствующий X-хромосоме. У женщин имеются две X-хромосомы, каждая из которых дает фрагмент 106 пар нуклеотидов. В исследованных девяти образцах в 4 случаях видны две полосы, а в 5 случаях - одна полоса. Следовательно, среди убитых было 4 мужчины и 5 женщин. Именно столько женщин было в царской семье в Екатеринбурге. Но имеют ли эти образцы отношение к членам царской семьи, остается неясным. Тест позволил установить только половую принадлежность, но не индивидуальные черты исследуемой ДНК.



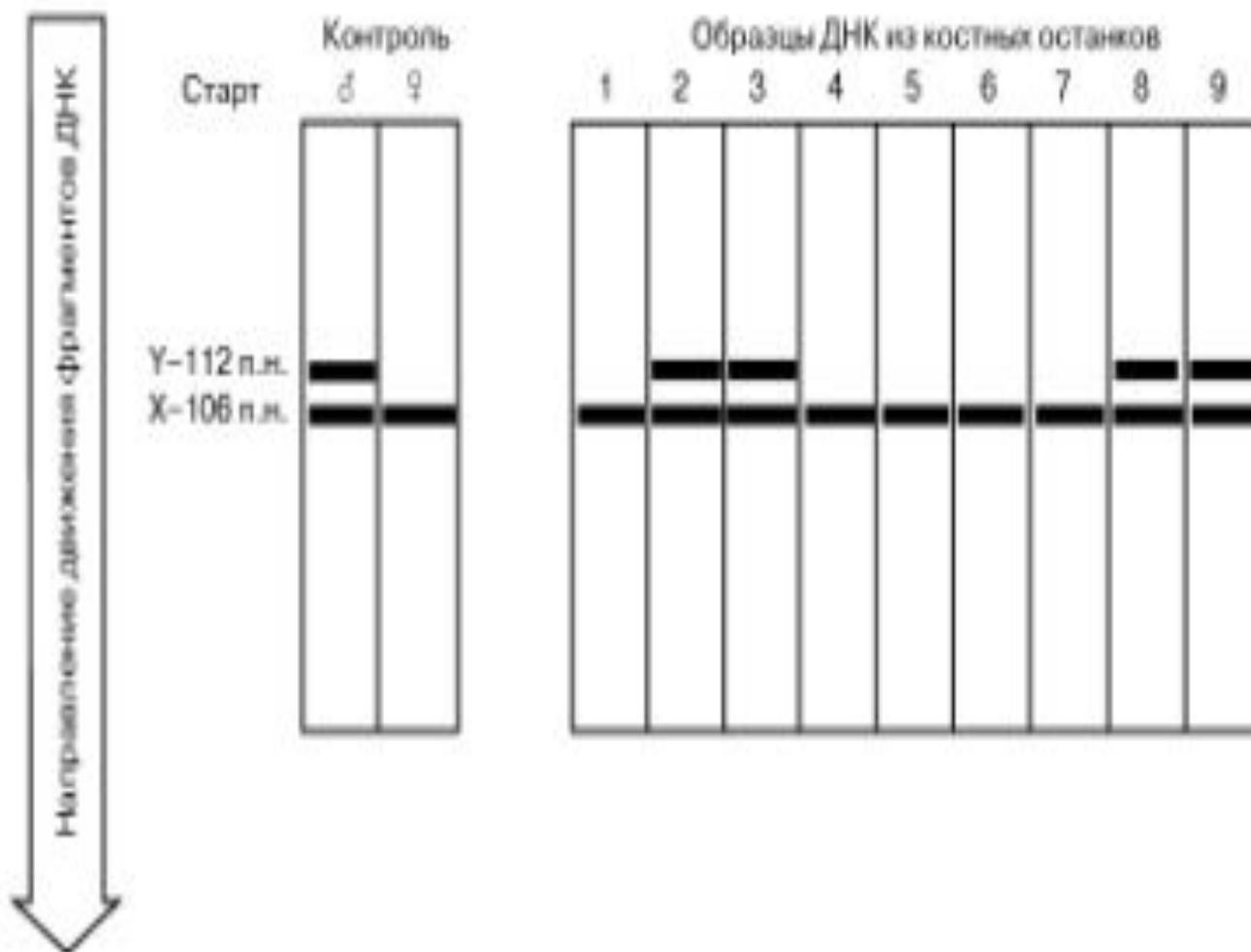


Рис. 2. Определение половой принадлежности по анализу ДНК из костных останков.

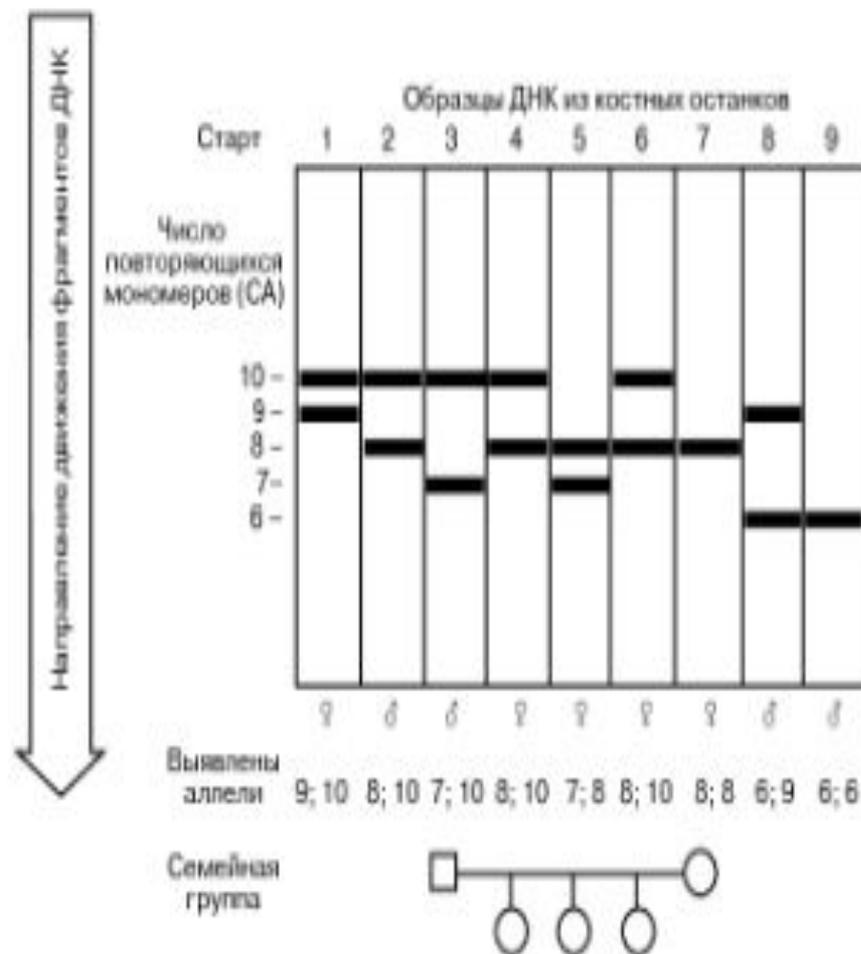


- На следующем этапе исследования необходимо было ответить на вопрос: есть ли в группе останки родственников и в какой степени родства были эти люди? Для установления генетического родства используют локусы, которые имеют не два аллельных состояния, как у гена амелогенина, а больше - пять или десять. Локусы, имеющие два или более аллельных состояния, называются полиморфными маркерами. Если проанализировать 5 локусов, каждый из которых может быть в пяти аллельных состояниях, то можно получить  $5^5 = 3125$  возможных вариантов сочетаний аллелей в конкретной хромосоме, то есть два неродственных индивида, у которых совпадает аллельное состояние всех пяти маркеров, будут встречаться не так уж часто. А вот у родственников аллельное состояние полиморфных локусов-маркеров совпадает: чем ближе родство, тем больше совпадений.



- На рис. 3 приведены результаты тестирования аллельного состояния 9 образцов ДНК из костных останков. Конечно, в каждой дорожке мы видим только два из пяти возможных фрагментов: ведь сколько бы аллелей всего ни существовало, у каждого человека есть только два гомологичных локуса и, следовательно, в геноме присутствуют только два аллеля по этому локусу. Наличие двух полос указывает на гетерозиготное состояние локуса TH01, а одной полосы - на гомозиготное. Например, в образце ДНК на дорожке 7 видна одна полоса, соответствующая гомозиготному состоянию локуса TH01, в котором присутствуют аллели с числом повторов мономера (CA), равным 8. Такой аллель называют TH01(CA)8 . В дорожке 3 видны две полосы, которые указывают на гетерозиготное состояние этого локуса: выявляются аллели TH01 (CA)7 и TH01 (CA)10 .





**Рис. 3.** Анализ аллельного состояния локуса TH01. Внизу указана семейная группа, выявленная по анализу аллельного состояния пяти полиморфных локусов.



- Например, по результатам анализа, представленного на рис. 3, мы видим, что индивид 3 (мужского пола по результатам предыдущего ДНК-теста, см. рис. 2) несет аллели (СА)7 и (СА)10 локуса TH01, и этот аллель отсутствует у индивидов 7, 8, 9. Следовательно, индивид 3 не может быть их отцом или сыном - у детей должен присутствовать какой-либо из аллелей родителя. В то же время индивид 3 может быть либо отцом, либо сыном индивидов 1, 2, 4, 5 или 6. Попробуйте сами установить по данным на рис. 3, родство между какими индивидами возможно, а между какими исключено.
- Аналогичные картины распределения аллелей были получены еще для четырех полиморфных локусов. По данным анализа, среди останков 9 скелетов была выявлена семейная группа из 5 человек: отец, мать и три дочери. Остальные 4 индивида не обнаруживают родственных связей ни между собой, ни с членами выявленной семейной группы. Можно утверждать, что если это семья царя, то отсутствуют останки царевича Алексея и одной из царевен.



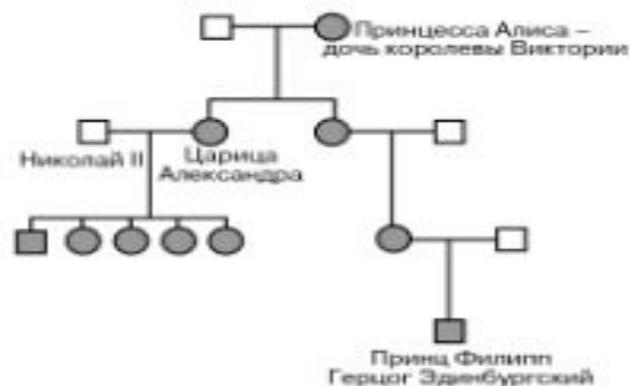
## АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК: В ЕКАТЕРИНБУРГСКОМ ЗАХОРОНЕНИИ НАХОДЯТСЯ ОСТАНКИ ИМПЕРАТОРА НИКОЛАЯ II И ЕГО СЕМЬИ

- В последние годы накоплено множество сведений о расположении различных STR-маркеров в геноме человека. Созданы международные компьютерные базы данных, позволяющие выявлять одинаковые комбинации маркеров не только у родителей и детей, но и у отдаленных родственников. Конечно, чем дальше родство, тем сложнее его выявить, ведь индивид передает 50% маркеров детям, внукам - 25% и т.д. Но если провести анализ по достаточно большому количеству STR-маркеров, родство будет установлено или исключено с большой степенью вероятности. Однако на момент проведения исследования останков из Екатеринбургского захоронения было известно лишь небольшое количество таких маркеров. Поэтому для проверки гипотезы о принадлежности останков Николаю II и его семье был выбран другой метод, более трудоемкий - определение последовательности нуклеотидов митохондриальной ДНК. Дело в том, что при оплодотворении цитоплазма сперматозоида, содержащая митохондрии, не попадает внутрь яйцеклетки. Зародыш получает митохондрии только из клеток матери. Последовательность нуклеотидов митохондриальной ДНК идентична у лиц, восходящих к общему предку по материнской линии. Как и в ядерной ДНК, в митохондриальной есть консервативные участки, одинаковые у всех людей. Они чередуются с переменными участками, нуклеотидная последовательность которых часто изменяется в результате мутаций. Один из таких переменных участков, так называемая D-петля, и был выбран для исследования. Как и в предыдущих экспериментах, участок ДНК размножали методом ПЦР, используя праймеры (начальные участки синтеза молекул ДНК), или комплементарные к соседним с D-петлей консервативным участкам.

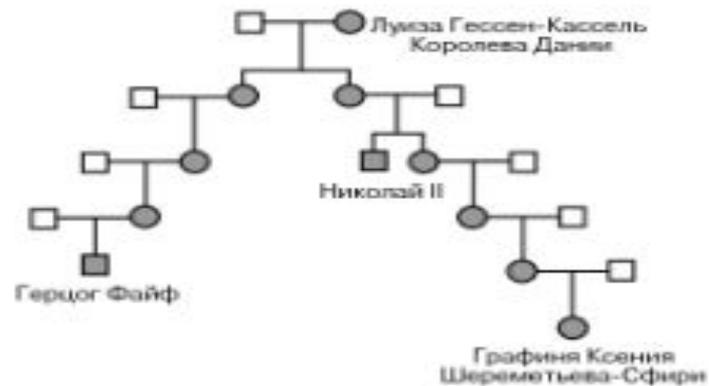


- В качестве объектов сравнения использовали ДНК, выделенную из крови ныне живущих родственников царя по женской линии (герцог Файф и графиня Шереметьева-Сфири) и царицы (герцог Эдинбургский). Родословные приведены на рис. 4 и 5. Данные анализа показали, что по сравнению с наиболее часто встречающейся в D-петле последовательностью СТСССТТТ у родственника царицы Александры выявлены две замены нуклеотидов (они указаны в табл. 1). Те же замены обнаружены в митохондриальной ДНК всех женских скелетов семейной группы. У обоих родственников царя выявлено четыре замены нуклеотидов в стандартной последовательности. Три из них полностью совпадали с последовательностью митохондриальной ДНК отца семейства из захоронения, однако четвертая замена отличалась. Возникло предположение, что это отличие было вызвано мутацией. Хотя три совпавшие замены однозначно указывают на родство, все же для достижения полной ясности была определена последовательность митохондриальной ДНК из останков Георгия Александровича Романова, брата Николая II. Нуклеотидные последовательности D-петли митохондриальной ДНК братьев оказались полностью идентичными. Это позволило сделать вывод, что обнаруженные в Екатеринбургском захоронении останки действительно принадлежат последнему российскому императору Николаю II и его семье. Результаты экспертизы, проведенной П.Л. Ивановым, позволили однозначно ответить на каждый из поставленных перед экспертной комиссией вопросов, причем два наиболее важных вопроса - о родстве между убитыми и их принадлежности царской фамилии - были разрешены исключительно в результате разработки и применения методов молекулярно-генетического анализа ДНК. Проведенное исследование создает основу для ДНК-тестирования лиц, считающих себя потомками императора Николая II. Теперь ответ о генетическом родстве может быть получен в тот же день, когда будет проведен анализ. Однако никто из лиц, объявлявших себя членами семьи императора Николая II или их потомками, пока не выразил желания пройти соответствующее тестирование...





**Рис. 4.** Материнская генеалогическая ветвь императрицы Александры Федоровны. Линии родственников, имеющих одинаковые последовательности митохондриальной ДНК, выделены штриховкой.



**Рис. 5.** Материнская генеалогическая ветвь императора Николая II. Линии родственников, имеющих одинаковые последовательности митохондриальной ДНК, выделены штриховкой.

**Таблица 1.** Последовательности митохондриальной ДНК

Источник ДНК	Стандартная последовательность СТССССТТ*	Результаты идентификации
Герцог Эдинбургский, образец крови	T . . . . . C	Царица Александра Царевна Царевна Царевна Царь Николай II
Скелет № 7, костные останки	T . . . . . C	
Скелет № 4, костные останки	T . . . . . C	
Скелет № 5, костные останки	T . . . . . C	
Скелет № 6, костные останки	T . . . . . C	
Скелет № 3, костные останки	. C Y . T T . . .	Царь Николай II
Герцог Файф, образец крови	. C T . T T . . .	
Графиня Шереметьева-Сфирн, образец крови	. C T . T T . . .	
Георгий Романов, костные останки	. C Y . T T . . .	

\* Точками обозначены нуклеотиды, совпадающие со стандартной последовательностью.



# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- Все методы, о которых рассказано в этой статье, основаны на результатах фундаментальных молекулярно-биологических исследований. Об этом свидетельствует присуждение Нобелевских премий в соответствующих областях науки, начиная с установления структуры ДНК (Джеймс Уотсон и Френсис Крик), исследования механизма синтеза ДНК на ДНК-матрице (Артур Корнберг), разработки метода определения последовательности нуклеотидов (Фредерик Сэнгер) до совсем недавнего открытия Кэри Мюллера, разработавшего схему полимеразной цепной реакции. Упомянутые исследования не носили прикладного характера, не имели сиюминутной практической значимости, да и целесообразность их проведения не была очевидной. Однако сейчас основанные на этих открытиях методики широко применяются в криминалистической экспертизе, медицине, сельском хозяйстве и биотехнологической промышленности. Метод ПЦР-анализа применим к любому геному, не только к геному человека. Например, ДНК-паспортизацию используют при продаже элитных животных, чтобы исключить их подмену. На основе ПЦР разработаны методы высокоточной лабораторной диагностики заболеваний, передающихся половым путем (хламидиоз, уреаплазмоз, микоплазмоз, цитомегаловирусная инфекция и СПИД). Достаточно, чтобы в пробе, полученной от больного или носителя, чувствующего себя пока еще абсолютно здоровым, присутствовала всего одна бактерия, чтобы при помощи ПЦР возбудитель заболевания был выявлен. Традиционные способы диагностики в этих случаях малоэффективны, а в первые несколько месяцев после заражения ВИЧ вирус в организме человека никаким иным методом, кроме ПЦР-анализа, вообще выявить невозможно.



- Что же касается исследований генома человека, то в настоящее время технически доступна ДНК-"паспортизация" людей. Такой паспорт невозможно потерять или подменить. Теоретически возможна и всеобщая ДНК-паспортизация. Это поможет избежать появления детей с наследственными дефектами или провести профилактическое лечение для предотвращения развития симптомов выявленных наследственных заболеваний. Но, с другой стороны, возможности тотальной ДНК-паспортизации могут рассматриваться как покушение на неприкосновенность личной жизни (неплохая тема для последователей Оруэлла и Замятина). Принятие решения о применении достижений науки, в том числе о проведении ДНК-диагностики, например, при подозрении на наличие ВИЧ-инфекции, или при ДНК-индивидуализации, то есть определении уникального сочетания молекулярно-генетических маркеров в данном геноме, лежит вне рамок самой науки - это право общества и индивида. Однако пока ДНК-индивидуализация чаще всего проводится по предписанию суда. Основное поле применения - установление биологического отцовства ребенка или установление идентичности ДНК подозреваемого с ДНК, выделенной из биологических материалов с места преступления (капли крови, спермы, волосы, фрагменты мягких тканей). Так, недавно в США широко освещался уголовный процесс по делу об убийстве Николь Симпсон и ее приятеля. Подозреваемый - звезда американского футбола О.Дж. Симпсон. Один из присяжных сказал в интервью, что должен был принять решение о виновности или невиновности Симпсона по данным ДНК-идентификации следов крови на месте преступления. Однако он не понимает, почему, по мнению экспертов, следы крови принадлежат именно подозреваемому и никому другому. Поскольку защита представила доказательства того, что один из полицейских, участвовавших в сборе вещественных доказательств, был уличен в расистских высказываниях, присяжные не приняли во внимание результаты тестирования ДНК и, заподозрив фальсификацию следов преступления, оправдали О.Дж. Симпсона.

