

MOLECULAR GENETIC
METHODS IN
DETECTIVE'S HANDS OR
AN EXAMPLE OF
FORENSIC STUDY OF THE
LAST RUSSIAN IMPERIAL
FAMILY'S REMAINS

N. K. YANKOVSKY

This article describes principles and methods of analysis in molecular genetics. The description is based on a real life study: DNA-based identification of skeletal remains of the the last Russian Royal Family. This article can be recommended for advanced studies of genetics in school.

В статье изложены принципы и методы современного молекулярно-генетического анализа, основанные на изучении структуры ДНК. Описание методов проиллюстрировано примером конкретного исследования – идентификацией костных останков последнего российского императора Николая II и его семьи. Статья может служить дополнительным материалом к разделу “Генетика” школьного курса биологии.

© Янковский Н.К., 1996

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В РУКАХ ДЕТЕКТИВА, ИЛИ ОПЫТ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСТАНКОВ СЕМЬИ ПОСЛЕДНЕГО РОССИЙСКОГО ИМПЕРАТОРА

Н. К. ЯНКОВСКИЙ

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

ВВЕДЕНИЕ

История изучения ДНК насчитывает более века – с момента открытия в ядрах клеток вещества, названного нуклеином. Полвека назад было доказано, что именно ДНК является носителем наследственности, а затем установлена ее принципиальная молекулярная структура – двойная спираль. В настоящее время молекулярная генетика, то есть изучение того, каким образом хранится и реализуется записанная в молекуле ДНК наследственная информация, является одной из наиболее бурно развивающихся областей науки вообще и биологии в частности. Для полной расшифровки генетического текста человека создана крупнейшая биологическая программа нашего времени. Только в США ежегодный объем финансирования по программе составляет около 200 млн. долларов. Сотни лабораторий в мире вовлечены в работу. В России исследования по этому направлению выполняются в рамках государственной научно-технической программы “Геном человека”.

С появлением молекулярной генетики методы генетических исследований принципиально обогатились. От привычных по школьным учебникам морфологических (цвет глаз, цвет семян) и биохимических (группа крови) признаков перешли к непосредственному изучению собственно молекулы ДНК. Такой переход связан с созданием хитроумных методов и подходов, позволяющих работать с признаками, выявляемыми на уровне исследования самой молекулы ДНК. А это не так уж просто: ДНК простенькой бактерии содержит миллионы пар нуклеотидов, а геном человека – более трех миллиардов пар. Вся ядерная ДНК в клетке человека содержится в виде 23 пар молекул, соответствующих хромосомам. Хромосомы каждой пары называются гомологичными. Линейные последовательности генов в них одинаковы, размер соответствующих гомологичным хромосомам молекул ДНК один и тот же. Исключение составляют половые хромосомы X и Y. Они сильно отличаются друг от друга по размеру и содержанию генов.

Геном человека содержит от 50 до 100 тысяч генов. Гомологичные гены (то есть гены, находящиеся в гомологичных хромосомах в одних и тех же локусах) определяют один и тот же признак (например, цвет глаз или группу крови), но могут находиться в разных аллельных состояниях, определяющих различные фенотипические проявления данного признака (глаза могут быть карими или голубыми и т.п.). Аллельные гены отличаются небольшими изменениями последовательности нуклеотидов в ДНК, которые в одних случаях приводят к изменению кодируемого геном продукта и соответствующему изменению фенотипа, а в других случаях никакого заметного влияния на фенотип организма не оказывают.

Уникальное сочетание аллельных состояний всех пар генов и определяет биологическую индивидуальность каждого человека. Например, последовательности ДНК автора и читателя (а также любых двух людей, кроме монозиготных близнецов) почти одинаковы — они различаются только одним нуклеотидом из трехсот. Эти различия на молекулярном уровне определяют то, чем мы друг от друга отличаемся внешне, — цвет волос, глаз, кожи, отчасти рост, вес. Выявление таких замен, определение их значения для развития того или иного признака организма в норме и патологии составляют предмет фундаментальных исследований в этой области науки. Полученные при этом результаты уже имеют множество практических приложений. Познакомимся с возможностями и принципами современных методов молекулярно-генетического анализа на конкретном примере, возможно, известном читателю из сообщений прессы.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДНК ИЗ КОСТНЫХ ОСТАНКОВ ПОСЛЕДНЕГО РОССИЙСКОГО ИМПЕРАТОРА НИКОЛАЯ II И ЧЛЕНОВ ЕГО СЕМЬИ

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. Исследования 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 позволяет получить большие количества изучаемого фрагмента ДНК даже в том случае, если в распоряжении исследователя имеется всего лишь одна исходная молекула геномной ДНК.

Метод ПЦР лежит также в основе ДНК-идентификации личности, установления родства людей,

выявления генов наследственных болезней и т.д. Схема метода ПЦР изложена в подписи к рис. 1.

Для определения размера полученных ПЦР-фрагментов их разделяют в геле, похожем на плотное желе. Через гель с образцами ДНК пропускают постоянный электрический ток. При этом, поскольку молекулы ДНК несут отрицательный заряд, фрагменты ДНК движутся к аноду. Чем меньше фрагмент, тем быстрее он преодолевает поры в геле и движется в нем и, соответственно, тем дальше уходит от линии старта. Такой процесс разделения фрагментов ДНК в геле называется электрофорезом. При этом все фрагменты ДНК из одной пробы движутся по одной и той же “дорожке” на геле, а фрагменты одного размера движутся с одинаковой скоростью и после окрашивания специальным красителем выглядят как тонкая полоска в геле.

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.

Выявление семейной группы по анализу аллельного состояния молекулярно-генетических маркеров ДНК

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,

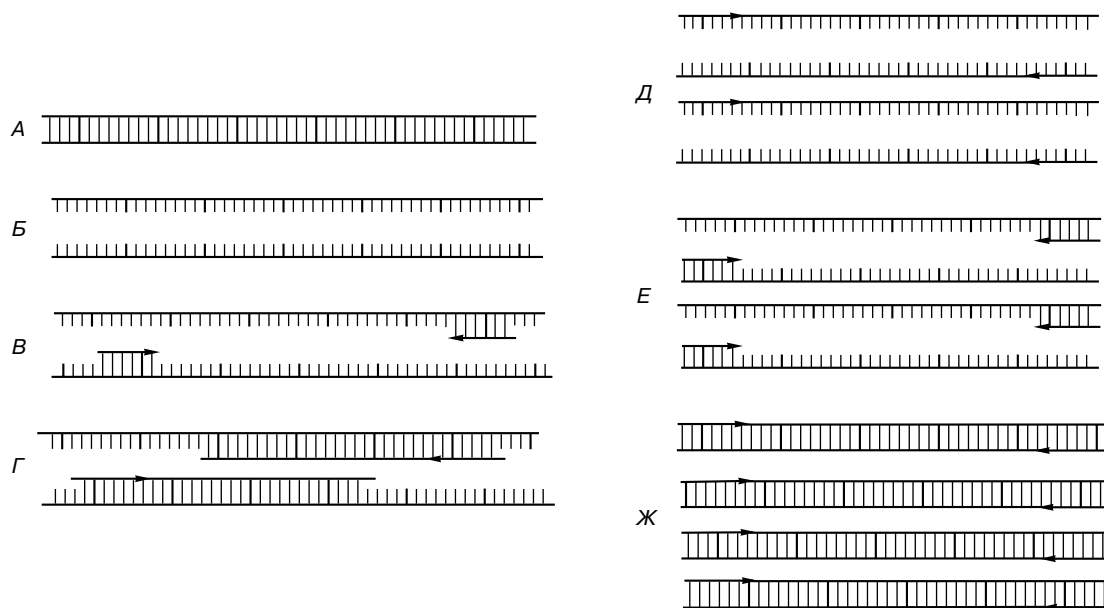


Рис. 1. Схема полимеразной цепной реакции.

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 редупликацию 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.

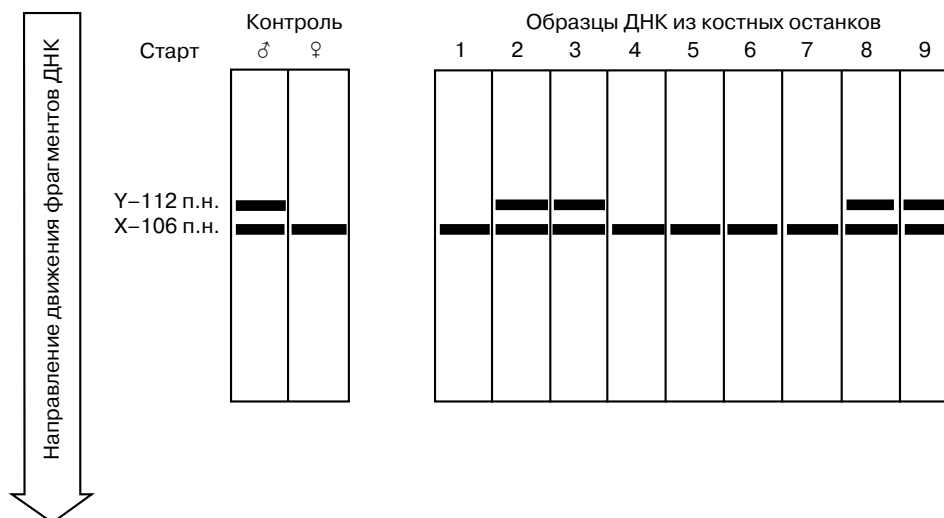


Рис. 2. Определение половой принадлежности по анализу ДНК из костных останков.

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.

Удобно использовать такие аллели, различия между которыми легко тестировать, как, например, в вышеприведенном случае с геном амелогенина, по разной длине ПЦР-фрагментов.

Для исследования ДНК из костных останков был выбран локус TH01 (впрочем, его название для понимания сути дела не существенно). Локус TH01 содержит многократно повторяющуюся динуклеотидную последовательность цитозин-аденин, обозначаемую латинскими буквами CA. Такие короткие повторы называются STR-повтором, или STR-маркером (от английского Short Tandem Repeat). Существует 5 аллелей локуса, содержащих от 6 до 10 копий повтора. Аллели легко различимы по размеру ПЦР-фрагментов, выявляемых в геле после электрофореза.

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 указы-

вает 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.

Сравнение аллельного состояния локуса TH01 для любой пары индивидов позволяет принять или отвергнуть гипотезу об их генетическом родстве по вертикали (родитель—ребенок). У ребенка размер одного фрагмента совпадает с размером одного из фрагментов матери, а размеры второго фрагмента — с одним из фрагментов отца. Если у двух индивидов не выявляются одинаковые полосы (например, на рис. 3 индивиды 1 и 5 или 7 и 8), то их родство по вертикали исключено, а если одинаковые полосы присутствуют (то есть присутствуют одинаковые аллели локуса), то родство возможно.

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 (CA)₇ и (CA)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

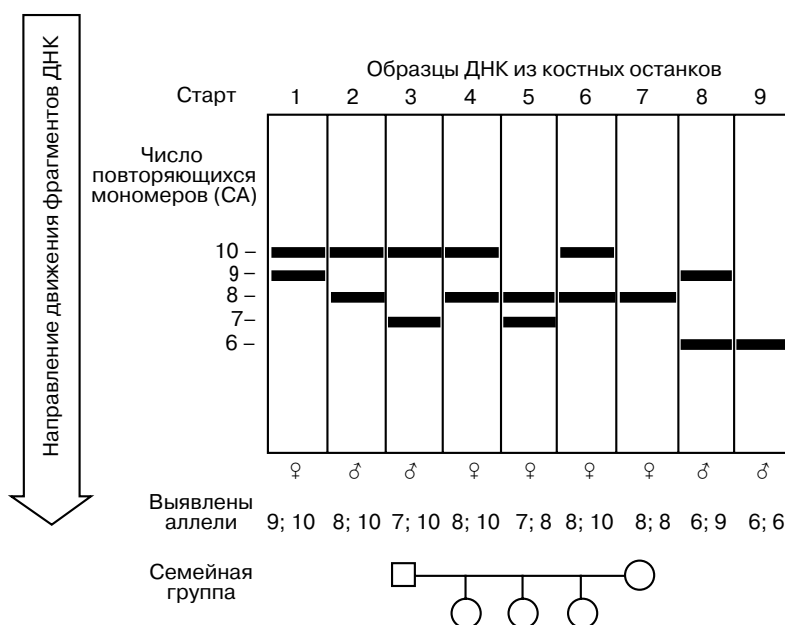


Рис. 3. Анализ аллельного состояния локуса TH01. Внизу указана семейная группа, выявленная по анализу аллельного состояния пяти полиморфных локусов.

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.

Заметим между прочим, что выявить мужа и жену при сравнении только их собственных образцов ДНК, конечно, нельзя. Их родство в юридическом смысле обычно подразумевает неродство генетическое. Супругов можно идентифицировать, если в анализируемой группе есть их дети. Идентификация родителей подтверждает, в свою очередь, выявление братьев и сестер в группе, потому что у них обнаруживаются только комбинации родительских аллелей и никаких других.

Пока генетические данные о семье, выявленной в Екатеринбуржском захоронении, ничего не говорят о том, действительно ли это семья царя Николая II и царицы Александры. Ответ на этот вопрос можно получить, сравнив образцы ДНК, предположительно принадлежащие царю и царице, с образцами ДНК их ныне живущих родственников.

Анализ митохондриальной ДНК: в Екатеринбуржском 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 Екатеринбуржского 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 совпа-

шие 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.

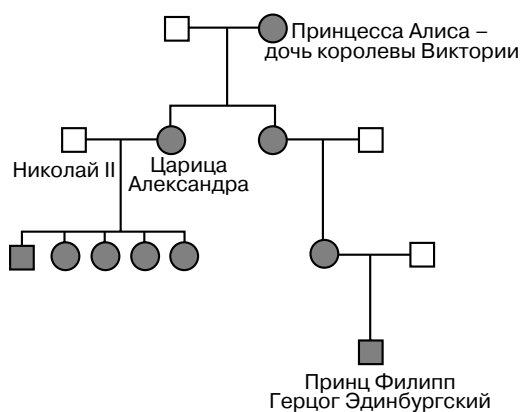


Рис. 4. Материнская генеалогическая ветвь императрицы Александры Федоровны. Линии родственников, имеющих одинаковые последовательности митохондриальной ДНК, выделены штриховкой.

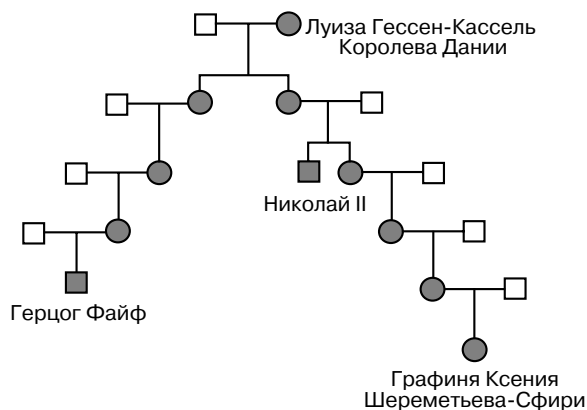


Рис. 5. Материнская генеалогическая ветвь императора Николая II. Линии родственников, имеющих одинаковые последовательности митохондриальной ДНК, выделены штриховкой.

Таблица 1. Последовательности митохондриальной ДНК

Источник ДНК	Стандартная последовательность СТСССТТТ*	Результаты идентификации
Герцог Эдинбургский, образец крови	Т С	Царица Александра Царевна Царевна Царевна Царь Николай II
Скелет № 7, костные останки	Т С	
Скелет № 4, костные останки	Т С	
Скелет № 5, костные останки	Т С	
Скелет № 6, костные останки	Т С	
Скелет № 3, костные останки	.СУ . ТТ . . .	Царь Николай II
Герцог Файф, образец крови	.СТ . ТТ . . .	
Графиня Шереметьева-Сфири, образец крови	.СТ . ТТ . . .	
Георгий Романов, костные останки	.СУ . ТТ . . .	

* Точками обозначены нуклеотиды, совпадающие со стандартной последовательностью.

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...

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.

Исследования, о которых говорится в этой статье, еще несколько лет назад были известны только узким специалистам. Однако теперь ДНК-индивидуализация и ДНК-диагностика наследственных и инфекционных заболеваний доступны каждому. Такого рода анализы проводят в лабораториях Москвы, Санкт-Петербурга, Новосибирска и других крупных городов России.

* * *

Николай Казимирович Янковский, доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией анализа генома Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. За внедрение методов биотехнологии и геной инженерии в практику в 1988 году удостоен премии Совета Министров СССР. Научные интересы – изучение генома человека. Н.К. Янковский является координатором одного из проектов российской программы «Геном человека». Читает курс лекций по структуре генома человека на биологическом факультете МГУ.