

mRNA profilizácia – nová výzva na identifikáciu forenzej stopy

Anotácia: Identifikácia biologického materiálu vo forenzej stope je dôležitou súčasťou kriminalistickej biológie, pričom pomáha predpokladať pravdepodobnosť úspechu analýzy DNA, ako aj následnú interpretáciu výsledkov. mRNA profilizácia je novou metódou na determináciu prítomnosti krvi, slín, vaginálnych sekrétov, menštruačnej krvi, spermy a potencionálne aj ďalších telesných sekrétov. Európska DNA profilizačná skupina (EDNAP) zorganizovala už druhý rok po sebe kolaboratívne cvičenie mRNA profilizácie zameranej na identifikáciu krvi, do ktorej sa zapojilo 16 svetových laboratórií (vrátane Bratislavy a Slovenskej Ľupče).

Kľúčové slová: DNA analýza, RNA, mRNA profilizácia, RNA markery, biologické stopy.

Analýza DNA v kontexte forenzných vied

Historické okamihy vo forenzej biológii sú tesne prepojené a zároveň závislé od rapidného rozvoja biotechnológie, molekulárnej biológie a genetiky, ako aj vedecko-technického rozvoja v jeho podstate.

V súčasnosti je analýza DNA využívaná nielen pri forenzej identifikácii stôp a osôb, ale aj na vylúčenie podozrivých osôb v súvislosti so zanechaním biologického materiálu na mieste činu, pri určovaní otcovstva a iných príbuzenských vzťahov, identifikácii obetí prírodných katastrof, hľadani nezvestných osôb, prípadne identifikácii neznámych mŕtvol a tiež pri historických štúdiách.

Technológie využívané pri DNA analýze sa líšia svojou schopnosťou diferencovať dvoch jedincov (tzv. sila diskriminácie – pravdepodobnosť, s akou sa dvaja náhodne vybraní jedinci v rámci populácie zhodujú v sledovaných znakoch, resp. v DNA profile) a rýchlosťou, ktorou možno získať výsledok. Rýchlosť analýzy DNA sa od 80-tych rokov dramaticky zvýšila; kým pred 20 rokmi, v časoch RFLP technológie, trvala analýza jednej vzorky 6 až 8 týždňov, v súčasnosti, pri využití komerčne dostupných multiplexov STR a kapilárnej elektroforézy, je možné získať výsledky už za niekoľko hodín, pričom vývoj neustále napreduje. Tento fakt môžeme považovať za jeden z hlavných dôvodov, prečo záujem o rozvoj molekulárnej biológie a zároveň DNA analýzy dominoval v oblasti forenzných vied v posledných dvoch desaťročiach¹.

V optimálnom prípade je výsledkom genotypizácie interpretovateľný DNA profil, definovaný aj ako alfanumerický kód. Výsledkom analýzy DNA nemusí však jednoznačne a vždy byť len interpretovateľný DNA profil. Pod pojmom výsledok totiž rozumieme v podstate akýkoľvek zistený fakt od bodu, keď začneme pracovať s biologickou vzorkou (v zmysle určenia typu biologického materiálu pomocou orientačných a špecifických skúšok) až po okamih, keď po prehladaní databázy zistíme zhodu DNA profilov. V ďalšom texte sa zameriame práve na metódy determinácie biologického materiálu vo forenzej stope, čo má nielen kľúčový vzťah k následnej úspešnej genetickej analýze, ale premieta sa aj do efektívnej interpretácie zistených výsledkov pri vyšetrovaní trestného činu.

Klasické metódy determinácie biologického materiálu

Analýza DNA umožňuje identifikáciu osoby už z nepatrného množstva biologického materiálu, postačuje dokonca niekoľko buniek obsahujúcich jadrovú DNA (30 pg DNA, teda 5 buniek). Na druhej strane však analýza DNA nevedie k determinácii druhu a pôvodu

¹ BAUER, M. RNA in forensic science. In *Forensic Science International: Genetics*, 1 (2007), p. 69-74.

biologického materiálu vo forenzej stope. V mnohých prípadoch je práve táto informácia významná z hľadiska súvislosti medzi hodnotou dôkazného materiálu a trestným činom. Informácia o biologickom materiáli je relevantná aj pre samotnú genetickú analýzu a jej úspešnosť.

V súčasnosti je bežnou rutinou identifikovať prítomnosť biologického materiálu v stope pomocou série orientačných a špecifických metód/testov, ktoré môžeme označiť ako konvenčné či klasické metódy. Ide zvyčajne o biochemické, sérologické a imunologické testy na identifikáciu telesných tekutín². Čoraz častejšie sa vo forenzných laboratóriách stretávame so zjednodušujúcim prístupom, pri ktorom sú orientačné a špecifické testy nahrádzané priamou genotypizáciou. Prívrženci takéhoto prístupu argumentujú, že demonštrácia prítomnosti ľudskej DNA je postačujúcim výsledkom a že typ bunky či tkaniva, z ktorého DNA pochádza, je irelevantná pre vyšetrovanie prípadu³. Na druhej strane takýto prístup nesie v sebe potenciálne riziko straty hodnotných informácií⁴. Možno konštatovať, že spoľahlivé určenie typu telesných tekutín, resp. tkaniva, poskytuje významný zdroj informácií pri rekonštrukcii konkrétneho trestného činu, najmä v spojitosti s násilnou a mravnostnou kriminalitou (napríklad diferenciácia krvi a menštruačnej krvi v prípade sexuálneho násillia a pod.)⁵.

Najčastejším biologickým materiálom vo forenzných stopách je krv a sliny, ďalej sperma, vaginálne sekréty a menštruačná krv. Krvné stopy sú rutinne testované rôznymi metódami, napr. Kastle-Meyerov fenoltaleínový test⁶, ortolidínový test⁷, diagnostickými prúžkami hemofan alebo využitím luminolu na báze chemoluminiscencie⁸. Uvedené orientačné – indikujúce, ale nie identifikujúce – testy sú založené na peroxidáze podobnej aktivite hemovej zložky hemoglobínu v ľudskej krvi. Aj z toho dôvodu je možná falošná pozitivita v prípade prítomnosti akýchkoľvek silných oxidantov, napríklad detergentov obsahujúcich chlór alebo pravých peroxidáz (rastlinné pletivá).

Biologické stopy obsahujúce sliny sú zvyčajne testované enzymatickou metódou na báze amylázovej aktivity alebo nedávno vyvinutou imunosorbentnou metódou⁹. V dôsledku pomerne rýchlej degradovateľnosti amyláz je časový interval na úspešné vykonanie spomínaných testov značne limitovaný. Okrem toho doteraz nebol vyvinutý test na jednoznačné rozlíšenie amyláz slín a iných amyláz (pankreatických, urinárnych a pod.).

Z uvedeného vyplýva, že konvenčné metódy na identifikáciu telesných tekutín sú časovo a pracovne náročné, technologicky rôznorodé a nie je možné ich automatizovať. Doteraz nebol vyvinutý test na jednoznačné potvrdenie prítomnosti vaginálnych sekrétov, a menštruačnej krvi. Vo forenznom laboratóriu nie je možné detegovať, o aký typ tkaniva ide

² NUSSBAUMER, C., GHAREHBAGHI-SCHNELL, E., KORSCHINECK, I. Messenger RNA profiling: A novel method for body fluid identification by real-time PCR. In *Forensic Science International*, 157 (2006), p. 181-186.

³ JUUSOLA, J., BALLANTYNE, J. Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. In *Forensic Science International*, 135 (2003), p. 85-96.

⁴ SETZER, M., JUUSOLA, J., BALLANTYNE, J.: Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains. *Journal of Forensic Science*, 53 (2008), p. 296-305.

⁵ ZUBAKOV, D., HANEKAMP, E., KOKSHOORN, M., van IJCKEN, W., KAYSER, M. Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples. In *International Journal of Legal Medicine*, 122/2 (2008), p. 135-142.

⁶ GARNER, D. D., CANO, K. M., PEIMER, R. S., YESHION, T. E. An evaluation of tetramethylbenzidine as a presumptive test for blood. In *Journal of Forensic SCIENCES*, 21 (1976), p. 816-821.

⁷ KOHN, J., O'KELLY, T. An ortho-tolidine method for the detection of occult blood in faeces. In *Journal of Clinic Pathology*, 8 (1955), p. 249-251.

⁸ WEBER, K. The use of chemiluminescence of luminol in forensic medicine and toxicology. I. Identification of blood stains. In *Dtsch. Z. Ges. Gerichtl Med.*, 57/3 (1966), p. 410-423.

⁹ QUARINO, L., DANG, Q., HARTMANN, J., MOYNIHAN, N. An ELISA method for the identification of salivary amylase. In *Journal of Forensic Sciences*, 50/4 (2005), p. 873-876.

v prípade zistených fragmentov orgánov na vecných stopách, aj napriek tomu, že tieto informácie by mohli mať pomerne vysokú investigatívnu silu pri súbežnom vyšetrovaní. Okrem týchto nevýhod treba spomenúť aj fakt, že vykonaním orientačných a špecifických skúšok z jedinečnej forenzej stopy strácame značnú časť biologického materiálu potrebného na úspešné vykonanie analýzy DNA.

Z týchto dôvodov narastá v posledných rokoch v kriminalistickej biológii potreba nahradiť konvenčné (enzymatické, biochemické, imunologické) metódy identifikácie biologického materiálu efektívnou molekulárnou metódou, ktorá by limity klasických testov prekročila.

mRNA profilizácia

Forenzný žurnál *Forensic Science International* uverejnil nedávno štúdiu autorov Juusola a Ballantyne¹⁰ o perspektívnej novej metóde na identifikáciu telesných tekutín v biologických vzorkách, a to prostredníctvom analýzy exprese tkanivovo-špecifických mRNA molekúl (markerov) v diferencovaných bunkách. Metóda bola označená ako mRNA profilizácia. Hlavnou výhodou vyvíjanej metódy je možnosť detekcie viacerých typov biologického materiálu v jedinej multiplexovej reakcii, simultánna izolácia, resp. koextrakcia DNA a RNA bez straty časti vzorky, potenciálna automatizácia a jednoznačnosť takto získaných výsledkov.

V porovnaní s konvenčnými testami je pri mRNA profilizácii významná vysoká špecifita a možnosť determinácie akéhokoľvek typu ľudského tkaniva, pri ktorom sú známe molekulárne markery mRNA¹¹.

Niektoré štúdie potvrdzujú, že mRNA (využiteľná na PCR reakciu typu reverznej transkripcie, tzv. RT-PCR) môže byť extrahovaná zo suchých krvných stôp starších ako 15 rokov. Na druhej strane nevyhovujúce podmienky skladovania, prípadne podmienky vonkajšieho prostredia môžu ovplyvniť stabilitu mRNA podstatne výraznejšie, ako je to pri DNA, takže v určitých prípadoch nie je možné izolovanú RNA využiť pre samotnú analýzu¹².

mRNA – štruktúra a stabilita

RNA a DNA sú nukleové kyseliny, ktoré sa navzájom odlišujú v troch hlavných znakoch. Po prvé, na rozdiel od dvojzávitnicovej DNA, RNA zohráva väčšinu svojich biologických úloh vo forme jednovláknovej molekuly a má podstatne kratšiu nukleotidovú sekvenciu. Po druhé, kým DNA obsahuje sacharidovú zložku deoxyribózu, v prípade RNA je to ribóza (monosacharid bez hydroxylovej skupiny v pozícii 2' pentózoového kruhu). Práve hydroxylové skupiny spôsobujú zníženú stabilitu RNA v porovnaní s DNA, v dôsledku rýchlej hydrolyzy. A po tretie, dusíkatou bázou komplementárnou k adenínu nie je tymín, ale uracil, teda nemetylovaná forma tymínu¹³.

Podobne ako DNA väčšina biologicky aktívnych foriem RNA, vrátane mRNA, tRNA, rRNA a snRNA, ako aj ďalších nekódujúcich RNA (napr. s regulačnou funkciou), obsahuje sekvencie, ktoré sú voči sebe komplementárne, pričom formujú sekundárnu štruktúru RNA

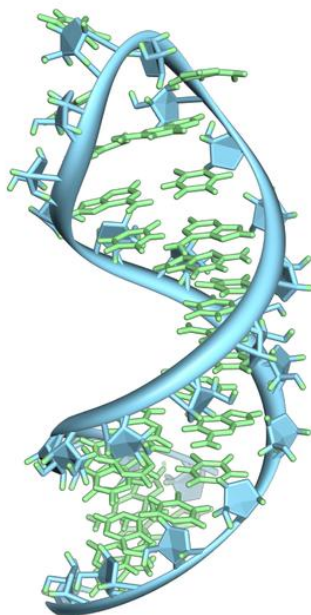
¹⁰ JUUSOLA, J., BALLANTYNE, J. Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. In *Forensic Science International*, 135 (2003), p. 85-96.

¹¹ ALVAREZ, M., JUUSOLA, J., BALLANTYNE, J. An mRNA and DNA co-isolation method for forensic casework samples. *Analytic Biochemistry*, 335 (2004), p. 289-298.

¹² SETZER, M., JUUSOLA, J., BALLANTYNE, J. Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains. In *Journal of Forensic Science*, 53 (2008), p. 296-305.

¹³ BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L. *Biochemistry (5th ed.)*. WH Freeman and Company. (2000), p. 118-119, p. 781-808.

podobnú dvojzávitnici (obr. č. 1). Štruktúrna analýza odhalila, že RNA existuje vo forme zhlukov krátkych helixov zvinutých do vysoko organizovanej formy pripomínajúcej štruktúru proteínov. Dosiahnutím spomenutej sekundárnej štruktúry nadobúda RNA katalytické vlastnosti enzýmov¹⁴. Identifikácia štruktúry ribozómov¹⁵, ktoré katalyzujú tvorbu peptidickej väzby pri syntéze proteínov, odhalila, že ich aktívne miesto je tvorené len RNA molekulami¹⁶.



Obr. č. 1: Sekundárna štruktúra mRNA – pôvodne jednovláknová RNA sa v dôsledku prítomnosti komplementárnych úsekov formuje do útvarov podobných dvojzávitnici. Svetlozelenou farbou sú znázornené dusíkaté bázy a modrou pentózo-fosfátová kostra¹⁷.

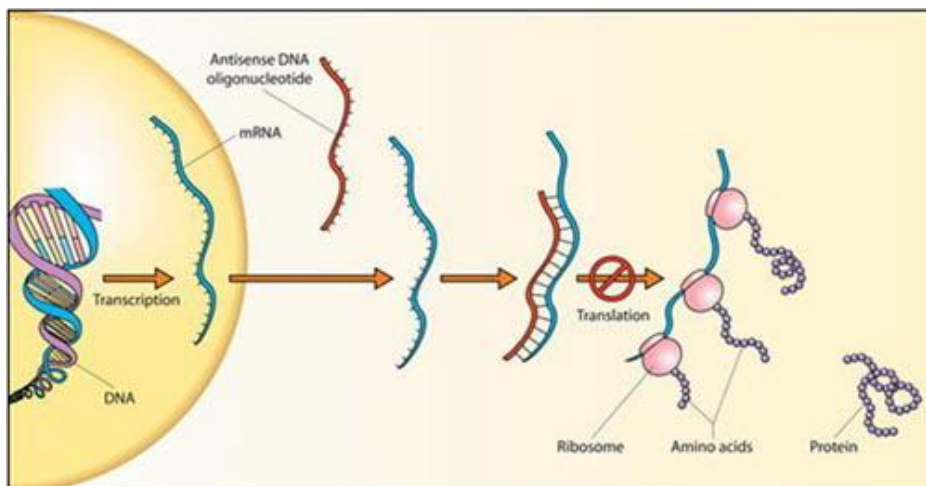
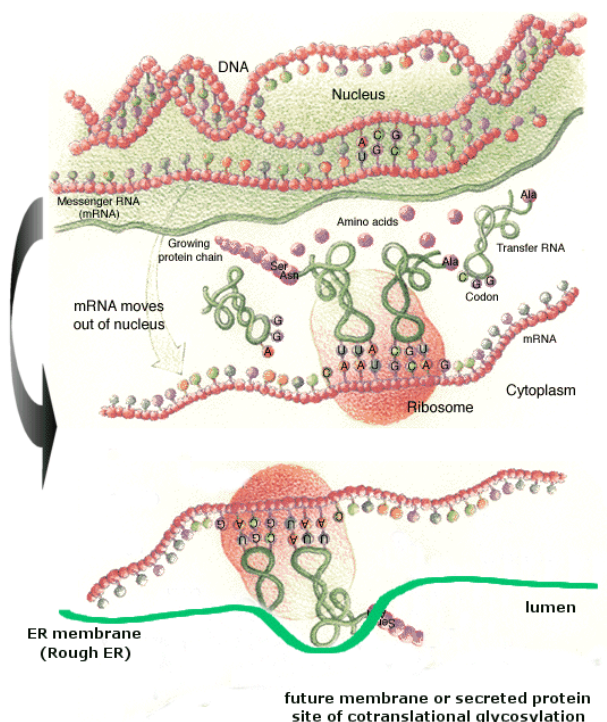
mRNA (messenger RNA) je molekulárnym intermediátom medzi DNA a proteínmi, kľúčovým pri translácii – odovzdávaní informácie medzi sekvenciou DNA a štruktúrou proteínov. Za syntézu mRNA zodpovedajú enzýmy RNA polymerázy, tento proces sa nazýva transkripcia. Následne je mRNA v bunke upravovaná sériou ďalších procesov, výsledkom ktorých je biologicky aktívna molekula (obr. č. 2).

¹⁴ HIGGS, P. G. RNA secondary structure: physical and computational aspects. In *Quarterly Reviews of Biophysics*, 33 (2000), p. 199-253.

¹⁵ Ribozómy sú bunkové organely nachádzajúce sa vo všetkých známych bunkách, čiže vo všetkých živých organizmoch. Sú uložené voľne v cytoplazme alebo viazané na endoplazmatické retikulum. Obsahujú RNA a bielkoviny. Prebieha v nich syntéza bielkovín (proteínov) - proteosyntéza. Ribozómy sú približne z jednej tretiny tvorené bielkovinami. Odlišujeme 2 základné typy týchto organel (pre prokaryoty a eukaryoty), pričom ribozóm sa delí na dve podjednotky s odlišnými veľkosťami. K ribozómu sa napája tzv. mediátorová ribonukleová kyselina (mRNA), ktorá obsahuje prepis genetickej informácie z deoxyribonukleovej kyseliny (DNA). Ribozóm potom podľa tejto informácie nasynetizuje polypeptid resp. proteín v procese, ktorý sa nazýva translácia.

¹⁶ NISSEN, P., HANSEN, J., BAN, N., MOORE, P. B., STEITZ, T. A. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. In *Science*, 289 (2000), p. 920-930.

¹⁷ Prevzaté a upravené podľa <http://en.wikipedia.org/wiki/RNA>.



Obr. č. 2: mRNA slúži ako templát pri syntéze proteínov (proteosyntéze). mRNA je transkribovaná z kódujúcej časti DNA, upravená a následne preložená pri translácii do primárnej štruktúry proteínov. Základnou šifrou pri budovaní sekvencie bielkovín je komplementarita informácie medzi trojicou nukleotidov v mRNA (tzv. kodónov) a jednou aminokyselinou v proteíne¹⁸.

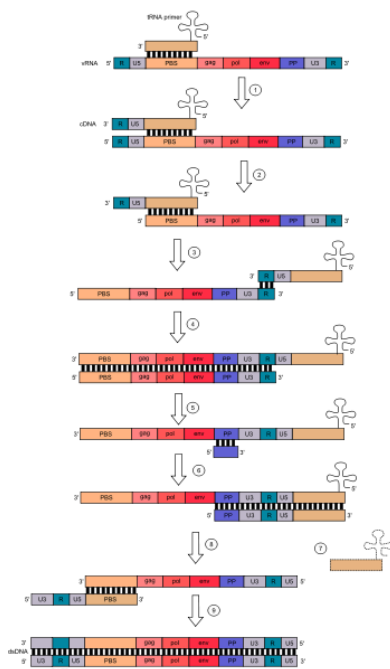
Využitie mRNA vo forennej praxi

Pomerne dlhé časové obdobie boli vedci skeptickí voči možnostiam využitia RNA vo forenzných biologických vedách. Jeden z podstatných argumentov bol fakt, že RNA molekula

¹⁸ Prevzaté z: <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/M/mRNA.html>.

je dokázateľne degradovateľná v krátkom časovom intervale po smrti jedinca (*post-mortem* degradácia) a taktiež má zníženú stabilitu mimo bunky (*in vitro*).

Spomínaný argument bol však vedeckými štúdiami postupne vyvrátený. Enormný potenciál RNA technológií spolu s nepredpokladanou vysokou stabilitou RNA v určitých definovaných podmienkach podnietilo forenzných vedcov sústrediť svoju pozornosť na nepreskúmanú oblasť RNA sveta¹⁹. Prvá vedecká štúdia v oblasti forenzných vied zaoberajúca sa využitím RNA vzhľadom na určenie *post-mortem* intervalu (PMI) pochádza z roku 1984²⁰, ďalšia, zameraná už na využitie analýzy génovej expresie v posmrtných tkanivách bola publikovaná až v roku 1994²¹. V nasledujúcich rokoch sa len ojedinele objavovali správy z výskumu RNA molekúl až do chvíle, keď bola uverejnená prvá zmienka o možnostiach využitia RT-PCR, metódy tzv. reverznej transkripcie²² (obr. č. 3).



Obr. č. 3: Pribeh reverznej transkripcie. RT-PCR je variantom polymerázovej reťazovej reakcie (PCR), ktorá sa v molekulárnej biológii využíva na získavanie veľkého množstva identických kópií želaného úseku DNA sekvencie v procese nazvanom amplifikácia. Pri RT-PCR je sekvencia RNA najprv prepísaná (transkribovaná) do komplementárnej DNA sekvencie, tzv. cDNA (complementary DNA) prostredníctvom enzýmu reverzná transkriptáza, a takto syntetizovaná cDNA je následne amplifikovaná tradičným postupom polymerázovej reťazovej reakcie²³.

V súčasnom období sa stretávame s viacerými oblasťami forenznej aplikácie RNA-metód. Jednou z nich je determinácia *post-mortem* stability RNA. Po smrti dochádza k rýchlej

¹⁹ BAUER, M.: RNA in forensic science. In *Forensic Science International: Genetics*, 1 (2000), p. 69-74.

²⁰ OEHMICHEN, M., ZILLES, K. Postmortale DNS- und RNS-synthese. Erste untersuchungen an menschlichen leichen, Z. Rechtsmed., 91 (1984), p. 287-294.

²¹ PHANG, T. W., SHI, C. Y., CHIA, J. N., ONG, C. N. Amplification of cDNA via RT-PCR using RNA extracted from postmortem tissues. In *Journal of Forensic Science*, 39 (1994), p. 1275-1279.

²² BAUER, M., KRAUS, A., PATZELT, D. Detection of epithelial cells in dried blood stains by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. In *Journal of Forensic Sciences*, 44 (1999), p. 1232-1236.

²³ Prevzaté a upravené podľa: http://en.wikipedia.org/wiki/Reverse_transcription_polymerase_chain_reaction.

degradácii RNA účinkom ribonukleáz prítomných v bunkách alebo pochádzajúcich z baktérií a inej environmentálnej kontaminácie. Orgány a tkanivá s vysokou hladinou ribonukleáz (pankreas, obličky, pečeň) vykazujú rýchlu fragmentáciu RNA²⁴, kým mozog, kosti a krvné bunky sú typické značnou mRNA stabilitou²⁵. Agonálne faktory v čase smrti ovplyvňujú *post-mortem* mRNA integritu, ako aj *pre-mortem* génovú expresiu a z tohto hľadiska je analýza mRNA vhodným diagnostickým nástrojom umožňujúcim determinovať mieru hypoxie mozgu, príčinu a čas úmrtia²⁶.

Zaujímavou sférou aplikácie mRNA je určenie doby vzniku vnútorných a vonkajších zranení, ako aj ich možný vzťah k príčine smrti. Doterajší výskum bol založený na sledovaní molekulárnych zmien v okrajoch rán, najmä z hľadiska imuno-histochemickej analýzy, v posledných rokoch badať mierny posun smerom k využitiu kvantifikácie mRNA markerov v poškodených tkanivách²⁷.

Predpokladá sa, že miera degradácie RNA koreluje s dobou vzniku forenzných stôp, čo doteraz nebolo možné determinovať. Fragmentácia RNA totiž pokračuje aj v *in vitro* podmienkach, dokonca pri dehydrovaných biologických materiáloch. Tento proces je relatívne pomalý a vykazuje istú variabilitu²⁸ v závislosti od podmienok vonkajšieho prostredia.

Analýza mRNA má nepochybne nesmierny význam aj pri identifikácii biologického materiálu vo forenznej stope. V súčasnosti je už známych niekoľko desiatok mRNA markerov pre rôzne typy telesných tekutín (krv, menštruačná krv, sperma, vaginálne sekréty, sliny), ktoré je možné detekovať na základe najnovších validovaných molekulárnych metód. Tieto však zatiaľ neboli dostupné pre forenzné laboratóriá a čakajú na ich postupnú implementáciu do bežnej forenznej praxe.

Princíp mRNA profilizácie pri identifikácii biologického materiálu

Syntéza mRNA v bunkách sa riadi špecifickými pravidlami a vedie k expresii jednotlivých RNA molekúl v rôznej kvantite. Práve detekcia mRNA markerov prítomných v biologickej stope v nadbytku umožňuje identifikovať konkrétny typ bunky alebo tkaniva, ktoré je obsiahnuté vo forenznej stope na mieste činu²⁹.

Terminálne diferencované bunky ako monocyty, alebo lymfocyty v krvi, spermatické bunky, bunky epitelu atď. sú charakteristické prísou reguláciou exprese konkrétnych génov. Niektoré gény sú v takýchto bunkách úplne inaktívne, a teda sa neexprimujú, iné, špecifické pre ten-ktorý typ bunky/tkaniva sa exprimujú v nadbytku. Každý typ bunky má preto jedinečnú sadu v rôznej miere syntetizovaných mRNA molekúl, ktorá sa volá aj transkriptóm³⁰. V súčasnosti sú pre každý typ biologického materiálu relevantného vo

²⁴ FINGER, J. M., MERCER, J. F. B., COTTON, R. G. H., DANKS, D. M. Stability of protein and mRNA in human post-mortem liver-analysis by two dimensional gel electrophoresis. *Clin. Chim. Acta*, 170 (1987), p. 209-218.

²⁵ HEINRICH, M., MATT, K., LUTZ-BONENGEL, S., SCHMIDT, U. Successful RNA extraction from various human postmortem tissues. In *International Journal of Legal Medicine*, 121 (2007), p. 136-142.

²⁶ BAUER, M.: RNA in forensic science. *Forensic Science International: Genetics*, 1 (2000), p. 69-74.

²⁷ OEMICHEN, M., LAGODKA, T., CROPELIN, A. RNA and DNA synthesis of epidermal basal cells after wounding. Comparison of vital and postmortem investigation. *Experimental Toxicology and Pathology*, 49 (1997), p. 233-237.

²⁸ BAUER, M., POLZIN, S., PATZEL, D. Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains? In *Forensic Science International*, 138 (2003), p. 94-103.

²⁹ SETZER, M., JUUSOLA, J., BALLANTYNE, J. Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains. In *Journal of Forensic Science*, 53 (2008), p. 296-305.

³⁰ CARON, H., SCHAIK, B., MEE, M., BAAS, F., RIGGINS, G. et al. The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. In *Science*, 291 (2001), p. 1289-92.

forenznej praxi (krv, sliny, sperma, vaginálne sekréty a menštruačná krv) identifikované známe molekulárne mRNA markery, ktorých detekcia potvrdzuje prítomnosť konkrétnej telesnej tekutiny vo vzorke.

Spolu s determináciou jedinečného transkriptómu jednotlivých buniek sa rozvíjali aj technológie umožňujúce jedinou reakciou určiť pôvod biologickej stopy mRNA profilizáciou³¹.

V priebehu dvoch rokov sa naše pracovisko podieľalo na implementácii mRNA profilizácie prostredníctvom metódy *end-point PCR*, pričom získané výsledky sú súčasťou širšej kolaboratívnej štúdie organizovanej Inštitútom súdneho lekárstva pri Univerzite v Zürichu.

Výsledky kolaboratívnej štúdie

Inštitút súdneho lekárstva pri Univerzite v Zürichu zorganizoval tento rok už druhýkrát na žiadosť Európskej DNA profilizačnej skupiny (EDNAP – European DNA profiling group) kolaboratívnu štúdiu zameranú na využitie novej metódy mRNA profilizácie pri identifikácii krvných stôp. Na štúdiu sa zúčastnilo pätnásť európskych laboratórií a 1 laboratórium z USA (USA – Florida, Holandsko, Veľká Británia, Slovensko – Bratislava a Slovenská Ľupča, Francúzsko, Rumunsko, Španielsko, Belgicko, Dánsko, Fínsko, Nórsko, Nemecko, Rakúsko).

Participujúce laboratóriá pri testovaní novej metódy používali komerčné súpravy a prístroje podľa vlastného výberu, dostupnosti a uváženia, pričom mali vyplniť zaslaný dotazník s opisom použitej metódy a chemikálií na upresnenie postupu.

Napriek odlišnosti použitých postupov možno konštatovať, že už v priebehu prvého roka pätnásť zo šestnástich zúčastnených forenzných laboratórií zvládlo úspešne navrhnutú metódu mRNA profilizácie – endpoint PCR (vrátane odelenia kriminalistickej biológie a genetickej analýzy KEÚ v Bratislave a Slovenskej Ľupči) aj bez akýchkoľvek predchádzajúcich experimentálnych skúseností s mRNA, čo je najvýraznejším z výstupov kolaboratívnej štúdie.

Prevažná väčšina zúčastnených laboratórií nemala žiadnu predchádzajúcu skúsenosť s prácou s RNA, ktorá vyžaduje okrem iného špeciálne protikontaminačné opatrenia. Primárnym cieľom štúdie bolo implementovať novú metódu ako alternatívu doteraz využívaných konvenčných testov na identifikáciu biologického materiálu vo forenznej stope a posúdiť zvýšenú citlivosť jednotlivých mRNA markerov, resp. výhodnosť a robustnosť, ako aj reproducibilitu navrhnutých parametrov.

Špecifita, citlivosť a krížová reaktivita mRNA markerov bola testovaná prostredníctvom analýzy fragmentov na genetickom analyzátore pre každý zo spomínaných markerov. Hodnoteným výstupom jednotlivých reakcií boli výsledky kapilárnej elektroforézy vo forme elektroferogramov, na ktorých detekovateľnosť jednotlivých markerov bola daná prítomnosťou a výškou píku (v relatívnych fluorescenčných jednotkách) v predpokladanej oblasti v závislosti od veľkosti amplifikátu.

V práci sme museli zvoliť vhodnú stratégiu a metódu so zameraním na výber komerčnej súpravy na izoláciu RNA, ktorá je kľúčovým krokom mRNA profilizácie. Zlyhanie metódy v tomto kroku znemožňuje získanie akýchkoľvek výsledkov. Dôraz treba pri tom klásť aj na protikontaminačné opatrenia. RNA molekuly sú pomerne rýchlo a efektívne degradovateľné RNázami. RNázy sú veľmi stabilné a aktívne enzýmy, ktoré nepotrebujú

³¹ NUSSBAUMER, C., GHAREHBAGHI-SCHNELL, E., KORSCHINECK, I. Messenger RNA profiling: A novel method for body fluid identification by real-time PCR. In *Forensic Science International*, 157 (2006), p. 181-186; JUUSOLA, J., BALLANTYNE, J. Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. In *Forensic Science International*, 135 (2003), p. 85-96.

na svoju aktivitu kofaktory, preto je pomerne náročné ich deaktivovať. Už malé množstvo RNázy postačuje na úplnú degradáciu bunkovej RNA. Z toho dôvodu bolo nevyhnutné optimalizovať pracovné prostredie na prácu s RNA a pracovať mimo miestností, kde sa pravidelne vykonáva izolácia DNA.

Po samotnej izolácii RNA z krvných vzoriek je potrebné ihneď postupovať v metóde reverznou transkripciou, ktorá umožňuje získať stabilnejšiu komplementárnu cDNA, aj táto je však podstatne náchyľnejšia na degradáciu v porovnaní s klasickou duplexnou formou DNA. Aj z tohto dôvodu je potrebné zvoliť vhodné reagenty a komerčnú súpravu v závislosti od cieľa jej použitia. Kľúčovým bodom mRNA profilizácie je aj samotná polymerázová reakcia, ktorej parametre bude v budúcnosti nevyhnutné optimalizovať a prispôbiť špecifikám použitých primerov, najmä v prípade vývoja nového multiplexu na mRNA profilizáciu.

Nežiaducim efektom, ktoré sme pozorovali vo výsledných elektroferogramoch (ako je výskyt externých pík, saturácia, krížové reakcie), by bolo možné predísť, alebo ich eliminovať úplne, a to kvantifikáciou RNA pred jej pridaním do reakcie reverznej transkripcie, čím by sa štandardizovala potrebná koncentrácia RNA. Bohužiaľ, doteraz nie je dostupný vhodný systém na kvantifikáciu ľudskej mRNA. Jediným, v súčasnosti používaným spôsobom kvantifikácie je vizualizácia RNA pomocou fluorescenčnej farbivky Ribogreen³², avšak výsledky sú výrazne ovplyvnené prítomnosťou bakteriálnej RNA. Metódu vizualizácie RNA spojenú s elektroforézou na agarózovom géli však úspešne použili Juusola a Ballantyne pri identifikácii telesných tekutín³³.

Výhodou zavedenia mRNA profilizácie do bežnej praxe je aj možnosť koextrakcie RNA a DNA z rovnakej vzorky, teda súčasná izolácia RNA a DNA z rovnakej časti forenzej biologickej stopy a ich následná analýza. Takýmto spôsobom je možné aj z obmedzeného množstva biologickej vzorky získať všetky hodnotné a potrebné informácie. V súčasnosti sa stretávame so situáciou, keď použitie konvenčných metód identifikácie telesných tekutín ustupuje samotnej DNA analýze v dôsledku minimálneho množstva biologickej stopy.

Predmetom ďalšej pokračujúcej kolaboratívnej štúdie bude dosiahnutie rovnakej senzitivity vo všetkých participujúcich laboratóriách, štandardizácia podmienok PCR, odstránenie problémov s krížovou reakciou s ostatnými bunkami a kvantifikácia RNA a zahrnutie ďalších testovaných telesných tekutín (sliny, sperma, vaginálne sekréty) do štúdie.

Výsledky kolaboratívnej štúdie boli publikované v karentovanom forenznom časopise (*Forensic Science International: Genetics*)³⁴.

Literatúra

ALVAREZ, M., JUUSOLA, J., BALLANTYNE, J. An mRNA and DNA co-isolation method for forensic casework samples. In *Analytic Biochemistry*, 2004, 335, str. 289-298.

BAUER, M., KRAUS, A., PATZELT, D. Detection of epithelial cells in dried blood stains by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. In *Journal of Forensic Sciences*, 1999, 44, str. 1232-1236.

BAUER, M., POLZIN, S., PATZEL, D. Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains? In *Forensic Science International*, 2003, 138, str. 94-103.

³² JONES, L. J., YUE, S. T., CHEUNG, C. Y., SINGER, V. L. RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: Ribogreen reagent characterization. *Analytical Biochemistry*, 265 (1998), p. 368-374.

³³ JUUSOLA, J., BALLANTYNE, J. Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. In *Forensic Science International*, 135 (2003), p. 85-96.

³⁴ HAAS, C., HANSON, E., JOHANSEN, P., MORLING, N., BALLANTYNE, J *et al.* mRNA profiling for the identification of blood – results of a collaborative EDNAP exercise, *in press*

BAUER, M. RNA in forensic science. In *Forensic Science International: Genetics 1*, 2007, str. 69-74.

BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L. *Biochemistry* (5th ed.). WH Freeman and Company., 2000, str. 118-119, str. 781-808.

CARON, H. et al. The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. In *Science*, 2001, 291, str. 1289-92.

FINGER, J. M. et al. Stability of protein and mRNA in human post-mortem liver-analysis by two dimensional gel electrophoresis. In *Clin. Chim. Acta*, 1987, 170, str. 209-218.

GARNER, D. D. et al.: An evaluation of tetramethylbenzidine as a presumptive test for blood. In *Journal of Forensic Sciences*, 1976, 21, str. 816-821.

GUBIN, N. A., MILLER, J. L. Human erythroid porphobilinogen deaminase exists in 2 splice variants. In *Blood*, 2001, 97, str. 815-817.

HAAS, C. et al. mRNA profiling for the identification of blood – results of a collaborative EDNAP exercise, In *Forensic Science International: Genetics*, in press.

HAAS, C. et al: mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. In *Forensic Science International: Genetics*, 2009, vol. 3, str. 80-88.

HEINRICH, M. et al. Successful RNA extraction from various human postmortem tissues. In *International Journal of Legal Medicine*, 2007, 121, str.. 136-142.

HIGGS, P. G. RNA secondary structure: physical and computational aspects. In *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2000, 33, str. 199-253.

JONES, L. J. et al. RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: Ribogreen reagent characterization. In *Analytical Biochemistry*, 1998, 265, str. 368-374.

JUUSOLA, J., BALLANTYNE, J. Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. In *Forensic Science International*, 2003, 135, str. 85-96.

JUUSOLA, J., BALLANTYNE, J. Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. In *Forensic Science International*, 2005, 152, str. 1-12.

KOHN, J., O'KELLY, T. An ortho-tolidine method for the detection of occult blood in faeces. In *Journal of Clinic Pathology*, 1955, 8, str. 249-251.

NISSEN, P. et al. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. In *Science*, 2000, 289, str. 920-930.

NUSSBAUMER, C., GHAREHBAGHI-SCHNELL, E., KORSCHINECK, I. Messenger RNA profiling: A novel method for body fluid identification by real-time PCR. In *Forensic Science International*, 2006, 157, str. 181-186.

OEHMICHEN, M., ZILLES, K. Postmortale DNS- und RNS-synthese. Erste untersuchungen an menschlichen leichen, In *Z. Rechtsmed.*, 1984, 91, str. 287-294.

OEMICHEN, M, LAGODKA, T., CROPELIN, A. RNA and DNA synthesis of epidermal basal cells after wounding. Comparison of vital and postmortem investigation. In *Experimental Toxicology and Pathology*, 1997, 49, str. 233-237.

PHANG, T. W. et al. Amplification of cDNA via RT-PCR using RNA extracted from postmortem tissues. In *Journal of Forensic Science*, 1994, 39, str. 1275-12

QUARINO, L. et al. An ELISA method for the identification of salivary amylase. In *Journal of Forensic Sciences*, 2005, 50/4, str. 873-876.

SETZER, M., JUUSOLA, J., BALLANTYNE, J. Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains. In *Journal of Forensic Science*, 2008, 53, str. 296-305.

WEBER, K. The use of chemiluminescence of luminol in forensic medicine and toxicology. I. Identification of blood stains. In *Dtsch. Z. Ges. Gerichtl Med*, 1966, 57/3, str. 410-423.

ZUBAKOV, D. et al. Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples. In *International Journal of Legal Medicine*, 2008, 122/2, str. 135-142.

http://en.wikipedia.org/wiki/Reverse_transcription_polymerase_chain_reaction

<http://en.wikipedia.org/wiki/RNA>

<http://www.daviddarling.info/encyclopedia/M/mRNA.html>

Key words: DNA analysis, RNA, mRNA profiling, RNA marker, biological stains.

Summary

Molecular forensic science has been predominated by DNA research in the past decade. The reason for this disproportion is the overwhelming success of DNA technology in criminalistics which has revolutionized modern policing – another cause is the gap between this sophisticated technology and the still very traditional way of practising (for example) forensic pathology.

DNA analysis could be used in forensic identification especially to identify potential suspects whose DNA may match evidence left at crime scenes, to exonerate persons wrongly accused of crimes, to identify crime and catastrophe victims, establish paternity and other family relationships, missing person identification and also historical investigations.

The molecular intermediate between DNA and proteins is mRNA, or messenger RNA crucial to get the DNA code out into the cell. RNA is expressed in a tissue-specific manner in the cell. In this time, an enormous potential of RNA technologies together with reports of unexpectedly high stability in certain conditions have stimulated forensic researchers all over the world to start exploring the RNA world. In forensic science, the first paper dealing with RNA was published in 1984 describing post-mortem RNA synthesis.

RNA analysis offers insight into disease and mechanisms leading to death and could develop into a valuable tool for diagnosis of the cause of death. Other possible applications include the determination of the age of wounds and injuries and of the post-mortem interval. Messenger RNA profiling is likely to play a major role in the future of forensic biochemistry, not only for the identification of body fluids and tissues, but also in the determination of the age of an individual (a stain donor), as well as the age of a stain (time since deposition). For us very interesting is especially the application of RNA technology in identification of body fluids.

During the past 10 years, the number of criminal cases solved by DNA profiling of evidence from the crime scene has increased tremendously. It is now a matter of routine, before attempting DNA analysis, it used to be standard practise to perform biochemical, serological and immunological tests to identify the body fluids comprising the biological stain. There are some problems associated with classic tests. Most of them are not specific, due, for example, to cross-reactions with other species or tissues. No such tests are available for the identification of vaginal secretions and menstrual blood. Conventional methods of body fluid identification use a variety of technological diverse techniques that are performed in a series, not parallel, manner.

Recently, the analysis of cell specific mRNA expression has been proposed as a promising new technique for the identification of body fluids in biological stains. Major advantages of mRNA profiling are the possibility of detecting several body fluids in one multiplex reaction and of simultaneously isolating DNA without loss of material.

Advantages of an mRNA-based approach, compared to conventional biochemical analysis (labor-intensive, performed in series, not parallel, time consuming and sample wasting), include greater specificity, simultaneous and semi-automated analysis through a common assay format, improved timeliness, decreased sample consumption, and compatibility with DNA extraction methodologies.

Two last years a collaborative exercises were organised by the Institute of legal medicine on behalf of the European DNA profiling Group – EDNAP in order to evaluate the robustness and reproducibility of mRNA profiling for blood identification in 16 forensic genetic laboratories using kits and chemistries of their own choice and using their own instrumentation. Since most of the participating laboratories had no prior experience with RNA, the primary goal was to implement the method and compare the sensitivities of the mRNA markers obtained in the various labs. The aim of collaborative study was to evaluate the robustness and reproducibility of mRNA profiling for blood identification and to find out this method could be relevant alternative to conventional presumptive tests.

15 of the participating laboratories successfully set up the method, using different kits and chemicals for RNA extraction, reverse transcription and PCR and using their own instrumentation. All of strategies used by the participating labs appeared to work successfully. In the future collaborative EDNAP exercises will be organised, and additional blood markers will be evaluated.

npor. RNDr. Barbara Sviežená, PhD.

mjr. Mgr. Andrej Choma, PhD.

experti oddelenia kriminalistickej biológie

a genetickej analýzy

Kriminalistického a expertízneho ústavu v Bratislave

e-mail: barbara.sviezena@minv.sk

andrej.choma@minv.sk

tel.(kl.): 57 321

Recenzent: doc. RNDr. Ľudevít Kádaši, DrSc.