

THE INFLUENCE OF SELECTED BIOLOGICAL FACTORS ON THE INTERPRETATION OF DNA PROFILES (IN STR POLYMORPHIC SYSTEMS) IN THE PROCESS OF FORENSIC IDENTIFICATION

Ireneusz SOŁTYSZEWSKI¹, Wojciech ACHREM²

¹ *University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Department of Criminalistics and Forensic Medicine, Olsztyn, Poland*

² *Criminalistics Laboratory, Voivodeship Police Headquarters in Szczecin, Szczecin, Poland*

Abstract

The paradigm accepted in the process of identification (both positive and negative) in forensic genetic research is the stability of the system of genetic polymorphism regardless of the type of biological substance collected. However, forensic expert practice indicates that there are situations in which donors of such material have modified DNA profiles (due to various factors). Accordingly, a comparison of the DNA profiles of evidence and reference material can lead to significant interpretative problems, and in extreme cases this may lead to an erroneous outcome of the identification process. The purpose of this article is to summarize current knowledge about possible DNA modifications that are important for the identification process.

Keywords

Individual identification; DNA analysis; Mutational variability; DNA profile modification; Chimerism; Uniparental disomy.

Received 22 November 2017; accepted 23 October 2018

1. Introduction

Polymorphic micro-satellite (short tandem repeat – STR) sequence analyses using the PCR technique may allow us to conclude that there are no differences between systems of polymorphic features of given evidence and reference material, which is interpreted as strong evidence in support of a hypothesis of the common origin of the analysed samples. This analytical technique is used to establish that individuals are related (e.g. to prove paternity), to identify corpses or human remains (Roewer, 2013), and to identify individuals. Analysis of STR-type systems is a method that is well-known (both on the theoretical and practical level) and fast, and (only) requires standard equipment in the genetic laboratory. The use of this analytical technology allows you to obtain a test result from

a small amount of degraded biological material that has been secured during a visual inspection of a crime scene. Taking into account the strengths and precisely defined weaknesses of this method, the obtained results of determinations of STR-type systems are reliable and of key significance for law enforcement and the judiciary.

Forensic genetics is based on the assumption that donors of biological material are people in whom the DNA profile is unchangeable and identical regardless of the type of biological substance donated (Jeffreys, Wilson, Thein, 1985). However, scientific research and laboratory practice have shown that there are a number of internal (individual) and external (environmental) factors which, by acting on the DNA sequence, may significantly influence the interpretation of obtained results. In such situations, a comparison

of the features of the evidence and reference material may lead to wrong conclusions, which in extreme cases result in an incorrect result of the identification process (Pelotti et al., 2007).

This paper presents selected biological factors that modify the DNA profile in polymorphic genetic systems of the STR type. Their selection was based on the analysis of published reports in the field of forensic practice. Although the presented disturbances are rare, they are a potential cause of errors in the interpretation of test results and forensic identification.

2. Variability – of microsatellite sequences – modifying DNA profiles

2.1. Molecular causes of variability

2.1.1. Mutations

Mutations are changes in the deoxyribonucleic acid sequence of organisms, which are caused by natural errors during its replication process, as well as by the action of physical and chemical factors. Structural changes in DNA caused by replication errors or induced by external factors are frequent and constitute pre-mutational changes. If they are not removed during the repair process, they may lead to mutational changes after the next replication cycles. Thanks to the existence of a multi-level repair system, mutational phenomena for STR systems occur in vivo at a rate of 3×10^3 (Kayser, de Knijff, 2011).

Mutational variability, which directly modifies DNA profiles, is important for forensic genetic analyses of STR systems. Changes in the body's systems of polymorphic features are caused by:

Point mutations, which concern a change in an individual base

Among point mutations, the most important are: transitions (consisting in incorporating by polymerase of a non-complementary purine base into a purine occurring in the matrix chain); transversions (consisting in incorporating a non-complementary pyrimidine base into a purine occurring in the matrix chain – or a purine into a pyrimidine); deletions (consisting in losing a single base), insertions (consisting in incorporating an additional base). In the process of individual identification, point mutations are important when they concern PCR primer binding regions (Leibelt et al., 2003).

Larger mutations relating to longer DNA sequences

From a practical point of view, the most important are: deletions (consisting in the loss of a larger fragment of the DNA sequence), insertions (consisting in the incorporation of additional bases originating from another part of chromosomes), rearrangements (consisting in a change in the position of DNA segments within introns and exons; Brown, 2018).

Mutations of the CNV type (copy number variation/variants)

Copy number variation consists in an increase or decrease in the number of copies in DNA segments in compared genomes. CNVs can occur in the form of both deletions and insertions. Most of the variation of this type is complex rearrangements resulting from multiple insertions, deletions or inversions of gene fragments (Marcinkowska-Swojak, Kozłowski, 2011). CNV contributes to the occurrence of triallelic patterns, or silent alleles (Balding, Steele, 2015).

Dynamic mutations

These consist in multiplying the number of repeats of a motif composed of two, three, four and – much less frequently – five nucleotides in a DNA sequence. The most probable cause of occurrence of this type of mutation is the phenomenon of polymerase slippage during DNA replication. Incorrect functioning of the enzyme leads to lengthening or shortening of the repetitive motif – the enzyme omits or incorporates a single segment depending on whether the slippage occurred on the template strand or on the daughter strand. Analysis of dinucleotide STR sequences has shown that polymerase regularly moves away from the duplicated strand during amplification. Trinucleotide repeats are less prone to enzyme “slippage” (Kashi, King, 2006), and tetra and penta units show resistance to such replication errors. Dynamic mutations concern both regions in genes and non-coding sequences which are characterized by polymorphism in terms of the number of repeats of a given motif.

Large genomic arrangements of the disomy type

A factor responsible for changes in the length of STR sequences may be the process of DNA recombination occurring during meiosis (crossing-over). In the case of repetitive areas, homologous sequences are inaccurately paired and DNA fragments of unequal length are exchanged, causing one of the alleles to lengthen (Amos, Sawcer, Feakes, Rubinstein, 1996). As a consequence, some of the alleles present in the mother and father will not appear in the DNA profile

of the offspring, which does not necessarily indicate the absence of kinship (Butler, 2006).

2.1.2. Mutagens

Mutagenesis is a natural phenomenon and contributes to the existence of variability in populations. This is a rare phenomenon that occurs once in about 10^7 incorporated bases. The frequency of spontaneous mutation increases when cells are exposed to the action of physical or chemical factors.

Physical mutagens

High energy ionising radiation (X-rays, γ -rays) contributes to DNA particle damage, which consists of breaking off of a single or double helix strand, modification of nitrogenous bases (purine or pyrimidine) attached to deoxyribose, and the formation of cross-links within one or two DNA strands and within nuclear proteins and DNA (Hasegawa, Yoshioka, Yoshioka, 1997). Nucleic acids are characterized by significant resistance to the action of this physical factor (Niemcunowicz-Janica et al., 2007).

Chemical mutagens

Mutations are induced especially by compounds that are structurally similar to the bases found in DNA. As a result of imprecise polymerase action and due to chemical similarities between bases and their analogues, the latter can be built into the DNA sequence during the replication process. The resulting mutations are the result of altered pairing of bases.

Another example of chemical mutagens is intercalating compounds, which interfere with the process of DNA replication by penetrating between adjacent base pairs in the double stranded helix. Intercalation of such a chemical compound into the double helix causes adjacent base pairs to move slightly away from each other, which results in a disorder of replication consisting in incorporating an additional single nucleotide at the intercalation site.

2.1.3. Microsatellite instability of cancer cells

One of the features of cancer cells is their genetic instability, which manifests itself in the following changes:

- *cytogenetic*: in the form of an increased number of breakages and numerical and structural aberrations of chromosomes (chromosomal instability CIN),
- *molecular*: microsatellite instability (MSI) is a change in allele length caused by an increase or decrease in the number of nucleotide repeats, allelic instability – loss of heterozygosity (LOH) is a deletion of one out of two studied alleles,

- *epigenetic* – instability resulting from incorrect methylation of DNA, rearrangement of chromatin structure and changes in histone protein structure.

Interpretation problems in identification tests most often result from loss of heterozygosity. This is an allelic instability, which manifests itself in a partial loss (at least 20%) of one of the alleles of DNA of cancer tissue, compared to a reference profile of the same person. The aberration occurs during replication or in the course of errors during post-replication DNA repair (Strand, Prolla, Liskay, Petes, 1993). Damage to the DNA repair system results in the inability to remove point mutations arising during preparations for cell division during interphase. As a result, the number of mutations increases by 100–700 times as compared to cells with an efficient DNA repair system (Wierzbicki et al., 2010).

Instability is determined by analyzing microsatellite sequences in relation to markers which are characterized by heterozygosity, i.e. they differ in the length of the repeated sequence of the maternal and paternal allele (Tomlinson, Lambros, Roylance, 2002).

When interpreting the results of genetic tests, special care should be taken in cases where only histopathological preparations are available for testing. The impossibility of verifying the determined profile by comparing the results with the system of polymorphic features obtained from another type of tissue may lead to the formulation of erroneous conclusions. If loss of heterozygosity or instability of the microsatellite sequence has occurred during the cancer transformation process, it is possible that different forms of the donor's genetic profile may occur, ranging from a system of features corresponding to the mixture (Li, Xie, Wu, 2014) to a different genotype (in the case of MSI) or total disappearance of one of the alleles (in the case of LOH, Butler, 2006). Experimental studies show that the frequency of LOH and MSI phenomena in a single locus is sufficiently high for these phenomena to be observed in expert opinion practice, but such changes in many STR loci are very rare and the probability of the occurrence of a completely different genetic profile is negligible (Pepiński et al., 2009).

2.1.4. Errors during cell division

Disturbances in the process of meiotic and mitotic divisions significantly affect forensic identification. One example of disturbances in chromosome segregation during cell division processes is uniparental disomy. As a result of an error during the division process in diploid cells of the body, homologous chromosome pairs are present, which originate from only one

instead of both parents (Engel, 1980). The literature describes four molecular mechanisms that cause this effect (Kotzot, Utermann, 2005).

- The first relates to irregularities at early stages of the first meiotic division. Nondisjunction (failure of chromosomes to separate properly during meiosis) results in the formation of gametes possessing an additional chromosome or gametes with a missing chromosome. When, during fertilisation, such an abnormal gamete unites with a normal reproductive cell originating from the other parent, a zygote with a trisomy of chromosomes is formed. The defence mechanism of the resulting organism is the random loss of one of the chromosomes of the zygote in order to preserve the body's diploid state (trisomy rescue). Inaccuracy of the repair process may lead to the elimination of the chromosome originating from the parent whose gamete was normal, and to the leaving of two copies of genetic material from the other parent (unreduced gamete). As a consequence, the descendant will inherit biological material from only one parent.
- The second mechanism concerns an error in the gametogenesis process: during meiotic division and segregation of genetic material in a reproductive cell originating from one of the parents, there will be no copy of a specific chromosome. During the fertilisation process, this abnormal gamete will unite with a normal reproductive cell originating from the other parent. As a result of fertilization, a monosomic zygote will be created. A repair mechanism will be triggered, this time involving duplication of the entire chromosome (monosomic rescue). As a result of the repair, a diploid organism will be created, which has two chromosomes originating from only one of the parents.
- The third cause of uniparental disomy is the process of fertilization by two abnormal gametes resulting from nondisjunction. One has two copies of the same chromosome; the other has no copy of the chromosome. As a result of the fertilisation process, a zygote with two homologous chromosomes will be formed, but the chromosomes will only come from one of the parents. This cause of uniparental disomy is very rare, because a necessary condition is for two abnormal gametes to unite in the fertilization process (gamete complementation).
- The last in the catalogue of errors that lead to uniparental disomy is an anomaly in the mitotic division of a zygote (directly after the fertilization process, post-fertilization error), consisting in the abnormal separation of sister chromatids in the anaphase of the mitosis process. The nondisjunction of sister

chromatids may result from too early shrinkage of the contractile ring composed of microfilaments. Furthermore, a similar effect may be engendered by a disturbance in the process of joining of the mitotic spindle to the kinetochores of the chromosome. For example, cells with monosomy in a pair of homologous chromosomes will exist in the body, which will undergo endoduplication in the repair system. As a result of the repair process, the cells will have the correct number of chromosomes, but one of the pairs will contain genetic material from only one of the parents.'

Variation in non-coding regions, which due to polymorphism are the basis for individual identification, usually does not have an effect on changes in proteins and thus on the functioning of the body. It also does not manifest in visible phenotypic changes. An expert in the field of genetic tests must therefore, right from the beginning of analysis of test results, assume that such a process could have taken place. In the case of attempting to establish kinship, failure to take into account the above described aberrations can lead to a false conclusion.

3. Interpretation of results and drawing conclusions

A characteristic feature of microsatellite sequences is their susceptibility to mutations. This means that it is necessary to take into account random changes during the process of forensic identification. Mutational variation in STR sequences consists in changes in the number of repeats of a repetitive unit, both by increasing and decreasing the size of alleles by one or many repetitions (Sun et al., 2012). It is also possible to have incomplete repetitions or point mutations (Ederveen, Lai, van Dreil, Gerats, Peters, 2015).

3.1. Mutations of longer DNA sequences

3.1.1. Y allele loss in amelogenin locus (deletion)

As a result of mutagenesis, deletion of a fragment of the Y chromosome in males may occur within the gene that codes proteins forming dental enamel (Sullivan, Mannucci, Kimpton, Gill, 1993). According to literature data, the frequency of this deletion is not high, amounting to about 6 out of 30,000 studied men in the Austrian population (Steinlechner, Berger, Niederatatter, Parson, 2002). In forensic genetic tests, this DNA sequence is used to establish the gender of a donor of biological material. In the case of deletion of a frag-

ment of DNA, to which PCR primers attach, no peak corresponding to the Y chromosome will appear on an electrophoretic image. In such a situation, the expert may incorrectly determine the gender of the individual. This is especially dangerous when the procedural authority commissioning the genetic tests has not provided comparative material. An erroneous conclusion in an expert opinion in which it is stated that female DNA has been isolated from a sample of evidence material and a profile has been defined may guide law enforcement agencies towards seeking a woman as the real perpetrator of the given crime. Analysis of an electropherogram may not provide a basis for ascertaining a mutation of this type. The morphology of electrophoretic peaks and their height do not indicate the influence of stochastic effects. In this situation, a detailed analysis of the results of RT-PCR is necessary. The use of reagents detecting genes located on the X and Y chromosome provides information on the gender of the donor of the biological material – such information should be compared with the DNA profile. If in the course of RT-PCR, the presence of a gene located on the Y chromosome is detected, but on the DNA profile printout there is no peak showing the Y chromosome in the amelogenin locus, this means that the donor of the biological material was a man. The second way to avoid erroneous determination of gender is to use PCR kits which contain, in addition to the amelogenin marker, at least one system located on the Y chromosome. Thanks to this, an expert, analysing a genetic profile in which s/he has not ascertained the presence of a signal from the Y chromosome and at the same time has obtained a PCR product in a polymorphic system located on the Y chromosome, can be sure that the biological material originates from a man, and that the lack of a signal in the Y position is caused by a mutation.

3.2. Mutations at the PCR primer binding site

3.2.1. Loss of the X allele at the amelogenin locus (transition)

If this phenomenon concerns biological material originating from a man, then only a Y allele is visible at the amelogenin locus on an electropherogram. If the biological material originates from a woman, then no PCR product signal will be visible at this locus. The irregular system of polymorphic features is the result of mutation consisting in the exchange of nucleotide C for T in the nucleotide sequence of binding of one of the PCR primers (Shewale, Richey, Sinha, 2000). Lack of complementarity causes PCR primers not to

bind, which will interfere with the correct course of the DNA amplification reaction. The frequency of such mutation events for the Polish population has been defined at the level of 1 in 5534 men (Maciejewska, Pawłowski, 2009).

Another reason for a lack of signal for the X allele at the amelogenin locus is the rare but natural population polymorphism also within the primer binding sequence during the PCR reaction. Complete elimination of this phenomenon is not possible in spite of the fact that PCR reagent kits contain additional reaction primers with a modified sequence. From the point of view of the expert these types of anomalies are easy to discern. Marker X occurs in both women and men, and thus its absence will not cause incorrect gender identification. After detection of such an artefact, it would be beneficial to test the sample using a set of reagents dedicated to determination of X chromosome polymorphism.

3.2.2. The phenomenon of DNA allele loss (drop-out) in heterozygous systems (deletion)

Loss of alleles is often observed in forensic genetic analyses. There are two types of this phenomenon. The first is loss of one of the alleles in a heterozygous system (allelic drop-out), whilst the second is loss of all alleles in a defined locus (locus drop-out; Butler, 2014). The main causes of occurrence of these phenomena are an insufficient amount or inappropriate quality of genetic material. DNA degradation (consisting in the cutting of nucleic acid fragments into shorter segments) results in longer sequences not being amplified. Insufficient concentration of DNA or contamination with PCR inhibitors also contribute to the occurrence of stochastic effects. The lack of a signal originating from alleles in a locus may indicate lack of genetic variation within conservative sequences, to which primers in the PCR bind. Nucleotide substitution will prevent PCR primers from binding (Butler, 2011). An experienced expert is able to define the causes of allele loss on the basis of an electropherogram. If the cause is the presence of a mutation, then there is no positive correlation between the length of the studied fragment and the probability of marker drop-out. Furthermore, the morphology of electrophoretic peaks is correct, their heights achieve the right values, and the heights of the signals of short and long fragments of DNA are similar to each other. The inter- and intra-locus balancing parameters are also at an acceptable level. Determination of the cause of the phenomenon of allele loss is significant from the point of view of statistical assessment of the obtained result.

If it is caused by mutational variation, and not by DNA quality, application of standard programmes for statistical analysis is not advisable. The algorithm used for statistical calculations implemented in these programmes assumes that the phenomenon of allele loss is caused by stochastic (random) effects, and not by mutational factors, whose probability of occurrence is estimated by other methods (Haned, 2011). In order to calculate the probability of alternative hypotheses in the case of allele loss caused by mutation, the expert should ascribe a neutral value (1) to this system, which means that the alternative hypotheses are equally likely.

3.3. Variation of the CNV type

Triallelic pattern in DNA profiles originating from one person (duplication)

In forensic practice, experts may encounter DNA profiles in which they observe the occurrence of three alleles at one or several loci, if the analysed genetic markers are situated on the same chromosome (Freeman et al. 2006). Replication of DNA sequences is caused by duplications of a fragment or of the whole chromosome, deletions, somatic mutations or mosaicism (Crouse, Rogers, Amriott, Gibson, Masibay, 1999). The occurrence of the triallelic pattern in forensic investigations is underestimated in the opinion of the authors. In the case of the analysis of a single locus, this phenomenon occurs extremely rarely, but when a set of reagents containing 15 polymorphic genetic systems is used for DNA profile determination, the triallelic pattern appears in approximately 1 in 1000 tested samples (Butler, 2014). An analysis of 5964 DNA profiles in Belgium revealed the presence of one triallelic pattern at locus D8S1179 and two at locus D18S51 (Mertens et al., 2009). The tendency in forensic examinations to use sets of reagents containing an increasing number of polymorphic STR systems (even as many as 20) causes this phenomenon to be observed more and more often. Duplication of chromosomes or parts of chromosomes also applies to sex chromosomes.

A triallelic pattern in a sample taken from evidence material may significantly influence the inference process. The sample may be misclassified as a mixture of DNA (especially if an additional third allele appears in several genetic systems). Two types of triallelic patterns have been distinguished. In the first one, the sum of the heights of the two smaller electrophoretic peaks of DNA is approximately equal to the value of the third one. In the second type, all three alleles are characterised by a similar height (Clayton, Guest, Urguhart, Gill, 2004). Studies indicate that the

first type of triallelic pattern is much more frequent. The triallelic pattern is the result of the inheritance of two chromosomes or a fragment of a second chromosome from one of the parents (Rolf, Wiegand, Brinkmann, 2002). During a paternity test in a child in the D3S1358 system, the triallelic pattern 17/18/19 was obtained. A sample of biological material from the mother (at the same locus her genotype is 15/17) and from the child's grandfather (from the alleged father's side) were provided for comparison. At this locus, the grandfather also had a triallelic pattern of 15/18/19. The father of the child inherited a diploid system from his father, which he passed on to his child. Additionally, tests were carried out on other polymorphic systems located on the third chromosome and none of them revealed a triallelic pattern. This suggests that the CNV phenomenon was caused by replication of a small fragment of the third chromosome (Vidal, Casar, 2008). The phenomenon of the occurrence of an additional allele is overlooked in laboratory practice. When it is located in the stutter position, despite exceeding the signal height limit value for this type of artifact (e.g. 10% of the height of the correct peak), it is often ignored. Experts also recognize the third allele as a minority component of the DNA mixture, which has revealed itself in only one locus.

Although the biological mechanism underlying the existence of the triallelic pattern is well known, the method of interpretation of the results of analysis is still controversial. Population data are the basis for drawing conclusions; however, the results of studies on the prevalence of this phenomenon in populations differ significantly from each other. An example of this is the triallelic pattern 10,12,13 of marker CSF1PO, which was reported with a frequency of 1 in 11,000 samples (International Commission on Missing Persons Database) and 1 in 31,330 (genetic laboratory database in South Korea; Butler, 2014). Generally, national genetic databases do not include DNA profiles with triallelic patterns. It is mainly for this reason that a statistical calculation model (meeting the condition of general acceptance by the scientific community) for estimating the frequency of DNA profiles containing triallelic patterns has not been created so far. In the opinion of the authors and on the basis of data found in the literature on the subject, it seems advisable to include the frequency of triallelic patterns in statistical calculations (Lukka et al., 2006). The literature presents types of triallelic patterns and describes an algorithm for recognizing them. Also, the procedures for the analysis of mixtures make it possible to distinguish whether a tested sample of biological material is in fact a mixture or whether there is no convincing

evidence for the presence of biological material from an additional donor in the sample (Gill et al., 2006). Therefore, it is proposed to carry out an analysis of the obtained result – in which a triallelic pattern has been found – according to the following scheme:

- Checking the test procedure by analysis of positive and negative control samples that have been included in the test cycle.
- Checking the concentration of DNA obtained after the isolation process, the level of inhibition, and the level of DNA degradation. These data are obtained by the expert after performing tests by the RT-PCR method using sets of reagents selectively determining male and female gender and determining the ratio of high molecular weight DNA to low molecular weight DNA. The obtained information provides a basis for estimating the possibility of the occurrence of stochastic phenomena.
- Analysis of the quality of the obtained DNA profile (peak height in RFU, morphology of electrophoretic peaks, presence of stutters and their height in RFU units).
- Analysis of the number of alleles at individual loci. If additional electrophoretic peaks appear, it is necessary to check whether the triallelic pattern in the profile occurs only at one locus, or at several loci situated on the same chromosome. Obtaining this information will make it possible to define whether the DNA profile originates from one person, or whether it is an image of a mixture of deoxyribonucleic acid.
- Estimating the probability of the drop-in phenomenon, i.e. the occurrence of an additional signal in the DNA profile – this involves verifying the test results for control samples (both positive and negative control for processes of DNA isolation and amplification) and calculating the probability of the appearance of an additional allele in relation to the test cycle. Usually this value is small and does not exceed 0.05.

After checking the above described indicators, the expert obtains information on the basis of which s/he is able to state that the observed genotype originates from one person, and that the additional allele is not an artefact. Control of the obtained result of analysis of the evidence material and the comparative material is the last element of verification of the hypothesis assuming that a triallelic pattern was determined in the sample. If it is possible, the analysis of samples in which a triallelic pattern has been determined should be repeated using a different set of PCR reagents.

It should be emphasized that (mathematical) formulae have not been developed for calculating the

frequency of occurrence of such a system of features in the population. It is therefore necessary to verify whether the DNA profile contains the equivalents of alleles that occur in the comparative material. In the case of achieving a match (especially in a triallelic system), this system should be given a value of "1" (neutral value, does not support any of the alternative hypotheses).

3.4. Uniparental disomy (UPD)

Irrespective of the molecular mechanism which is the cause of this phenomenon, the electrophoretic image of the DNA profile does not change. During qualitative analysis of an electropherogram, the expert observes electrophoretic peaks of correct morphology. There are no symptoms indicating the presence of mixtures of DNA. DNA profile parameters, such as allele height balance in heterozygous systems within individual loci and between polymorphic systems, are correct. A problem faced by the expert is inheritance of polymorphic genetic features that is not consistent with the Mendelian model (Kotzot, 2001). The offspring possesses a system of polymorphic features that is exactly the same as one of the parents. Usually, segregation of features that is incompatible with the laws of Mendel concerns only those systems that are located on one of the chromosomes, which may lead to the erroneous exclusion of kinship. The first stage in the process of analysis of the result of genetic testing should thus be checking whether the identified person has features that s/he has inherited from both parents. If the answer to this question is negative, it is necessary to establish the reason for the differences. In the case of identification of a man, verification of the existence of kinship is accomplished by analysing STR polymorphic genetic systems located on the Y chromosome. Due to the rapid pace of mutation of some polymorphic systems, differences may arise between DNA haplotypes of the father and son (Kayser et al., 2000). In the situation described above, the expert has to deal not only with non-fulfilment of the assumptions of the Mendelian inheritance model, but also with a difference in haplotypes. The ascertained differences are still not sufficient grounds for excluding a person. Analysis of polymorphism of genetic systems located on the X sex chromosome may be helpful for establishing kinship. In the case of a male offspring, he inherits chromosome X markers from his mother. A daughter inherits these markers from her father and mother. In the literature, a case has been described of correct forensic identification in a disputed paternity case in which the phenomenon of UPD

located on chromosome 21 was diagnosed. As a result of tests on polymorphic genetic systems located on autosomal chromosomes, it turned out that in Penta D and D21S11 systems, the genotype of the son was consistent with the mother's DNA profile. The offspring did not possess alleles inherited from his father. In the remaining studied polymorphic genetic systems, segregation of features proceeded in accordance with the laws of Mendel. Therefore a doubt arose, which was attempted to be solved by means of analysis of the Y chromosome haplotype. Analysis showed a single difference in alleles in the DYS389II system between the alleged father and son (it was one repetitive unit). Further tests on the offspring using markers located on chromosome 21 showed that the genetic material was inherited only from the mother. This led to the supposition of the existence of the phenomenon of UPD 21. The inconsistency of results of tests on the DYS389II system was explained by mutation. Thanks to an in-depth analysis, the man was not ruled out as the biological father (Mansuet-Lupo et al., 2009).

In order to avoid erroneous conclusions, during determination of kinship, the expert should:

- Check whether the condition of correct segregation of polymorphic features from the parental generation to the offspring generation is fulfilled.
- If genetic differences are found between the child and parents, it is essential to check whether these differences concern features located on one or on different chromosomes.
- If the differentiation only concerns systems of polymorphic features located on one chromosome, then the expert should check whether the inheritance disorder consists in transferring alleles from only one of the parents.
- Genetic testing in polymorphic genetic systems should be repeated using a set of reagents which contains other genetic systems located on the chromosome, in relation to which there is a suspicion of an incorrect method of inheritance.
- In the case of identification of a man, it would be advisable to perform tests on polymorphic genetic systems located on sex chromosomes Y and X, and in the case of identification of a woman – tests on polymorphic systems located on X chromosomes.
- During statistical analysis of results of genetic testing in situations where there is a disturbance of the inheritance model, mathematical algorithms used to estimate the probability of kinship will erroneously indicate absence of kinship. There are no population data that describe this phenomenon comprehensively. Only the frequencies of UPD in relation to Prader-Willi Syndrome (in 25–30% of patients

with this illness, the cause was maternal UPD 15) and Angelman syndrome (in 2–3% of patients, the cause of the disease was paternal UPD 15) have been estimated (Kotzot, Utermann, 2005). The scale of the phenomenon in the case of this type of aberration on other chromosomes, which do not cause phenotypic effects, is as yet unknown. Cases of uniparental disomy concern maternal cells three times more frequently than paternal cells (Bocian, 2000).

According to the authors, when an expert shows that the cause of disturbance of the Mendelian inheritance model is uniparental disomy, s/he should definitely consider the hypothesis of the existence of kinship. A prerequisite for forensic identification based on genetic testing is a statistical discussion of the obtained results. The problem which the expert must solve is to ascribe a numerical value to partial hypotheses relating to genetic systems in which the UPD phenomenon has been diagnosed. In the opinion of the authors, the expert should accept the numerical value “1” for these polymorphic systems in statistical calculations. In the testing of alternative hypotheses, this is a neutral value, which does not favour any of the assumptions. As a result, none of the hypotheses is excluded from further analyses.

The phenomenon of uniparental disomy influences the process of kinship determination (Bein, Driller, Schurmann, Schneider, Kirchner, 1998; Wegener, Weirich, Dauber, Mayr, 2006); however, it is not relevant during comparison of DNA profiles of evidence material with reference material.

3.5. Cellular chimerism

3.5.1. Molecular causes of variation

Allogeneic bone marrow transplantation (from an unrelated donor) is a procedure in which haematopoietic cells of the recipient are replaced by cells of the donor (Jólkowska, Witt, 2004). Bone marrow transplantation leads to the occurrence in the body of the donor of a phenomenon known as haematopoietic chimerism. In the case of allogeneic transplant, so-called complete chimerism usually occurs, when only donor cells are found in liquid tissue. In some cases, mixed chimerism is observed, where both the recipient's own cells and donor cells are present in the bone marrow and peripheral blood of the recipient. Mixed chimerism may be transitory: some time after transplantation – after (initial) domination by donor cells – the recipient's own cells begin to dominate again; chimerism

may be permanent in a situation where cells of the donor dominate (Shamshad, Ahmed, Bhatti, Ali, 2012).

In these types of situations, a method that allows detection and study of the phenomenon of chimerism is analysis of STR microsatellite markers and minisatellite markers (Lin et al., 2013). It is important to select the STR panel in such a way that will allow differentiation of the donor genotype from the recipient genotype (Odriozola, Riancho, Colorado, Zarrabeitia, 2013). It should be emphasized that examination of blood and swabs taken from epithelial cells from the oral mucosa may not be sufficient to establish the correct profile of the examined person (Jacewicz, Lewandowski, Rupa-Matysek, Jędrzejczyk, Berent, 2015). For it has been found that only hair follicle cells are a material that is devoid of donor chimerism and may therefore constitute reference material for the needs of forensic medical tests (Dauber et al., 2004). When an expert, analysing a DNA profile, suspects that a person has undergone bone marrow transplantation, s/he should pay attention to the type of comparative material collected. If possible, both blood and a buccal swab should be collected (Berger et al., 2013).

3.5.2. Interpretation of test results and drawing conclusions

From the point of view of the expert in the field of genetic testing, bone marrow transplants from another person – both related and unrelated – are of the greatest significance (due to results of genetic analyses of polymorphism). In 2011, 377 allogeneic transplants of haematopoietic cells were carried out in Poland (*Rejestr przeszczepów komórek krwiotwórczych szpiku i krwi obwodowej* [Register of transplants of bone marrow hematopoietic cells and peripheral blood], 2012). This number does not seem to be high, and the probability of encountering this problem during forensic genetic testing is low. However, two such cases have been described in the Polish literature (Benedycka, Trynda, Wysocka, 2015; Miąskiewicz, Skonieczny, 2007); so there is a real problem concerning the way of interpreting the obtained result of a genetic test and the possibility of performing a forensic identification on its basis. Genetically, the recipient's organism is a chimera, which means that there are two cell lines: the recipient's own and that of the donor. The chimerism is visible on an electropherogram as the appearance of two cell lines in the genetic systems; more than two alleles may be present in the loci. Genetically, therefore, it is a mixture of DNA originating from 2 persons. In cases described by Jacewicz et al. (2015) results of analyses showed

that after allogeneic transplant of hematopoietic cells, only a DNA profile originating from another person – the donor – was found in blood samples collected from the recipient. No additional alleles were ascertained on the electropherograms. In buccal swabs, however, the presence of DNA mixtures was found – cell lines of the recipient and donor were visible. DNA profiles determined from hair taken from the recipient were consistent with the recipient's system of polymorphic features). Such a situation may be permanent. Up till now in comparative material collection protocols there has been no box (field) for entering transplant data. Legal regulations actually prohibit disclosure of data covered by medical confidentiality without a relevant court decision. If comparative material in the form of blood collected from a person suspected of committing a crime (who has had an allogeneic transplant) is provided for genetic testing, then the expert, when determining the DNA profile, does not know that s/he has determined a DNA profile of a person other than the one from whom blood has been collected. This raises a number of doubts:

- A comparative analysis of the genetic profile determined from the evidence material (blood) secured at the site of commission of the crime with the same biological material taken from the suspect after an allogeneic transplant will lead to its exclusion. The risk of misidentification is high in the case of analyses of unsolved crimes that took place a dozen or so or several dozen years ago (in the case where the transplant took place between commission of the crime and collection of reference material).
- A match between genetic profiles determined in blood (secured as evidence material) and human liquid tissue (reference material) will lead to identification of the donor of the cells for transplantation, and not to the person who left the biological forensic trace (transplantation before the crime).
- Inadvertently introducing the genetic profile of a donor of cells for transplantation (in the case of testing biological material collected from a person post-transplant) into a database of genetic information may lead to incorrectly linking the recipient with other, identical genetic profiles, entered into the database as NN traces, and left at the scene of the crime by the donor of cells for transplantation.

As laboratory practice has shown, in the last decade, the standard reference material collected for genetic testing has been a buccal swab. This results not only from legal regulations (Order of the Minister of Justice, 2005), but also from practice. Kits for collecting biological material for genetic testing are available on the market, and the procedure for collecting such

a reference sample is maximally simplified. If a person from whom biological material is collected in the form of a buccal swab has undergone an allogeneic transplant, then there is a high probability that the expert will obtain a DNA mixture from the collected comparative material. Cell lines of the recipient and the donor will be visible in the profile. A DNA mixture can also be obtained when contamination of reference material has occurred (pre-laboratory error, error in the laboratory; Pająk, Wierzchosławski, 2013). The expert is therefore obliged to control the quality of the testing process in the laboratory (exclusion of laboratory contamination) and to repeat the testing, using a second swab from the kit, in order to confirm the correctness of the process of biological sample collection. When errors have been ruled out at every stage of the testing, the expert giving the opinion informs the judicial body about the need to collect comparative material in the form of blood and hair. After obtaining the requested samples, control genetic tests are carried out. As a result, the DNA profile from the blood sample corresponds to the profile of the haematopoietic cell donor, whilst the system of polymorphic features obtained from the hair is consistent with the DNA profile of the recipient of these cells. It is possible to carry out a mathematical separation of genotypes on the basis of a DNA mixture obtained from a buccal swab (Clayton, Whitaker, Sparkes, Gill, 1998). Individual DNA profiles of the recipient and donor of the transplanted cells are determined, taking into account all possible combinations of alleles. Comparison of the results obtained for samples with results for comparative material of tests on comparative material will allow a further process of identification.

Individual identification on the basis of secured blood traces left at the scene of a crime by a perpetrator who has had a transplant constitutes a controversial issue. From the forensic point of view, a match between DNA profiles of evidence material and comparative material is meaningless. For the DNA profile of the donor of haematopoietic cells for transplantation has been determined by the test, i.e. a person other than the real perpetrator.

4. Conclusions

In the procedure leading up to issuing of the expert opinion, attention should be paid to factors that occur rarely, but may have key significance for correct interpretation of test results. In each of the situations described above, the occurrence of erroneous interpretation of test results is possible, due to changes

in genetic material of donors of biological material. It is difficult to estimate the scale of the described phenomena and it not even possible to roughly calculate the probability of occurrence of such cases. This does not change the fact that knowledge about the causes of occurrence of natural disorders and methods of their detection, as well as the ability to interpret statistically in non-standard situations, are essential in the work of the expert. Therefore the authors postulate that the training process implemented within the management system should also take into account the above mentioned issues. The legislator in the Code of Criminal Procedure allows for the possibility of obtaining additional information which is necessary for preparing an expert opinion. Data on a transplantation performed, or information on the health status of persons from whom reference material for identification has been collected, would be useful for drawing up an expert opinion. It is therefore necessary to reiterate the *de lege ferenda* demand for a change in the legal framework, which would allow the expert to have access (in justified cases, of course) to certain medical information in order to use it to formulate conclusions about the evidence.

References

1. Amos, W., Sawcer, S. J., Feakes, R. W., Rubinsztein, D. C. (1996). Microsatellites show mutational bias and heterozygote instability. *Nature*, 13(4), 390–391.
2. Balding, D. J., Steele, C. D. (2015). *Weight-of-evidence for forensic DNA profiles*, 2nd Edition. Chichester: Wiley.
3. Bein, G., Driller, B., Schurmann, M., Schneider, P. M., Kirchner, H. (1998). Pseudo-exclusion from paternity due to maternal uniparental disomy. *International Journal of Legal Medicine*, 111(6), 320–330.
4. Bendycka, A., Trynda, A., Wysocka, B. (2015). Genetyczna chimera. Problem oznaczenia profilu DNA u osób po przeszczepie szpiku kostnego. (In) J. Czapska, A. Okrasa, *Bezpieczeństwo – Policja – Kryminalistyka* (pp. 324–330). Kraków: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego.
5. Berger, B., Parson, R., Clausen, J., Berger, C., Nachbaur, D., Parson, W. (2013). Chimerism in DNA of buccal swab from recipients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantations: implications for forensic DNA testing. *International Journal of Legal Medicine*, 127(1), 49–54.
6. Bocian, E. (2000). Disomia jednorodzielska (UPD) u człowieka. Mechanizm powstawania i skutki kliniczne. *Postępy Biologii Komórki*, 27(3), 295–314.
7. Brown, T. A. (2018). *Genomy*, wyd. 2. zmienione. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.

8. Butler, J. M. (2011). *Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology*. Waltham: Academic Press.
9. Butler, J. M. (2014). *Advanced topics in forensic DNA typing: Interpretation*. Oxford: Academic Press.
10. Butler, J. M. (2006). Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *Journal of Forensic Sciences*, 51(2), 253–265.
11. Clayton, T. M., Guest, J. L., Urquhart, A. J., Gill, P. D. (2004). A genetic basis for anomalous band patterns encountered during DNA STR profiling. *Journal of Forensic Sciences*, 49(6), 1207–1214.
12. Clayton, T. M., Whitaker, J. P., Sparkes, R., Gill, P. (1998). Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling. *Forensic Science International*, 91(1), 55–70.
13. Crouse, C., Rogers, S., Amriott, E., Gibson, S, Masibay A. (1999). Analysis and interpretation of short tandem repeat microvariants and three-banded allele patterns using multiple allele detection systems. *Journal of Forensic Sciences*, 44(1), 87–94.
14. Dauber, E. M., Dörner, G., Mitterbauer, M., Wenda, S. Fae, I., Glock, B., Mayr, W. R. (2004). *Discrepant results of samples taken from different tissues of a single individual*. (In) C. Doutremépuich, N. Morling (Eds.), *Progress in Forensic Genetics 10* (pp. 48–49). Amsterdam: Elsevier.
15. Ederveen, A., Lai, Y., van Dreil, M. A., Gerats, T, Peters, J. L. (2015). *Modulating crossover positioning by introducing large structural changes in chromosomes*. Retrieved November 11, 2017, from: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-015-1276-z>.
16. Engel, E. (1980). A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *American Journal of Medical Genetics*, 6(2), 132–143.
17. Freeman, J., Perry, G., Feuk, L., Redon, R, McCarroll, S. A., Altshuler, D. M., Aburatani, H., Jones, K. W. (2006). Copy number variation: new insight in genome diversity. *Genome Research*, 16(8), 949–961.
18. Gill, P., Brenner, C., Buckelton, J., Carracedo, A., Krawczak, M., Mayr, W. R., Morling, N., Prinz, M., Schneider, P. M., Weir, B. S. (2006). DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixture. *Forensic Science International*, 160(2–3), 90–101.
19. Haned, H. (2011). Forensim: an open-source initiative for the evaluation of statistical methods in forensic genetics. *Forensic Science International: Genetics*, 5(4), 265–268.
20. Hasegawa, K., Yoshioka, H., Yoshioka, H. (1997). DNA damage by various radiations. *Radiation Physics and Chemistry*, 49(1), 81–84.
21. Jacewicz, R., Lewandowski, K., Rupa-Matysek, J., Jędrzejczyk, M., Berent, J. (2015). Niebezpieczeństwa wynikające z profilowania DNA materiałów biologicznych pochodzących od osób po allogenicznym przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych (al-
lo-HSCT) w odniesieniu do analiz z zakresu genetyki sądowej. *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii*, 65(4), 225–247.
22. Jeffreys, A., Wilson, W., Thein, S. (1985). Individual-specific “fingerprints” of human DNA. *Nature*, 316(6023), 76–79.
23. Jółkowska, J., Witt, M. (2004). Chimeryzm komórkowy po transplanacji szpiku kostnego. *Acta Haematologica Polonica*, 35(3), 321–328.
24. Kashi, Y., King, D. (2006). Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends in Genetics*, 22(5), 253–259.
25. Kayser, M., Roewer, L., Hedman, M., Henke, L., Henke, J., Brauer, S., Krüger, C., Krawczak, M., Nagy, M., Dobosz, T., Szibor, R., de Knijff, P., Stoneking, M., Sajantila, A. (2000). Characteristic and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by directing observation in father/son pairs. *American Journal of Human Genetics*, 66(5), 1580–1588.
26. Kayser, M., de Knijff, P. (2011). Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nature Reviews Genetics*, 12(3), 179–192.
27. Kotzot, D. (2001). Complex and segmental uniparental disomy (UPD): review and lessons from rare chromosomal complements. *Journal of Medical Genetics*, 38, 497–507.
28. Kotzot, D., Utermann, G. (2005). Uniparental disomy (UPD) other than 15: phenotypes and bibliography updated. *American Journal of Medical Genetics*, 136(3), 287–305.
29. Leibelt, C., Budowle, B., Collins, P., Daoudi, Y., Moretti, T., Nunn, G., Reeder, D., Roby, R. (2003). Identification of a D8S1179 primer binding site mutation and the validation of a primer designed to recover null alleles. *Forensic Science International*, 133(3), 220–227.
30. Li, Y., Xie, M., Wu, J. (2014). DNA profiling in peripheral blood, buccal swabs, hair follicles and semen from a patient following allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. *Biomedical Reports*, 2(6), 804–806.
31. Lin, M., Tseng, L., Beierl, K., Harada, S., Hafez, M. J., Eshleman, J. R., Gocke, C. D. (2011). Analysis of hematopoietic stem cell transplant engraftment: use of loss or gain of microsatellite alleles to identify residual hematopoietic malignancy. *Diagnostic Molecular Pathology*, 20(4), 194–202.
32. Lukka, M., Tasa, G., Ellonen, P., Moilanen, K., Vassiljev, V., Ulmanen, I. (2006). Triallelic patterns in STR loci used for paternity analysis: evidence for a duplication in chromosome 2 containing the TPOX STR locus. *Forensic Science International*, 164(1), 3–9.
33. Maciejewska, A., Pawłowski, R. (2009). A rare mutation in the primer binding region of the amelogenin X homologue gene. *Forensic Science International: Genetics*, 3(4), 265–267.

34. Marcinkowska-Swojak, M., Kozłowski, P. (2011). The influence of copy number polymorphism on the human phenotype. *Postępy Biochemii*, 57(3), 240–248.
35. Mansuet-Lupo, A., Henke, J., Henke, L., Blank, C., Ernsting, A., Kozłowski, P., Rouger, P., Van Huffel, V. (2009). A paternity case with three genetic incompatibilities between father and child due to maternal uniparental disomy 21 and mutation at the Y chromosome. *Forensic Science International: Genetics*, 3(2), 141–143.
36. Mertens, G., Rand, S., Jehaes, E., Mommers, N., Cardoen, E., De Bruyn, I., Leijnen, G., Van Brussel, K., Jacobs, W. (2009). Observation of tri-allelic patterns in autosomal STRs during routine casework. *Forensic Science International: Genetics*, 2(1), 38–40.
37. Miąskiewicz, H., Skonieczny, M. (2007). Problemy z opiniowaniem w przypadku wystąpienia anomallii genetycznej. *Problemy Kryminalistyki*, 255, 52–54.
38. Niemcunowicz-Janica, A., Janica, R. J., Pepiński, W., Janica, J., Filipowski, T., Juczevska, M., Barszczewski, J., Skawrońska, M., Koc-Żurawska, E. (2007). Wpływ napromieniowania bombą kobaltową wybranych tkanek na identyfikację genetyczną. *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii*, 57, 256–258.
39. Odriozola, A., Riancho, J. A., Colorado, M., Zarrabeitia, M. T. (2013). Evaluation of the sensitivity of two recently developed STR multiplexes for the analysis of chimerism after haematopoietic stem cell transplantation. *International Journal of Immunogenetics*, 40(2), 88–92.
40. Pająk, K., Wierchosławski, R. (2013). Profilowanie genetyczne śladów daktyloskopijnych – problem wtórnego transferu materiału biologicznego. *Problemy Kryminalistyki*, 280, 58–64.
41. Pelotti, S., Ceccardi, S., Alu, M., Lugaresi, F., Trane, R., Falconi, M., Bini, C., Cicognani, A. (2008). Cancerous tissues in forensic genetic analysis. *Genetic Testing*, 11(4), 397–400.
42. Pepiński, W., Soltyszewski, I., Skawrońska, M., Rogowski, M., Zalewska, R., Kozłowski, L., Filipowski, T., Janica, J. (2009). Loss of heterozygosity (LOH) – implications for human genetic identification. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 47(1), 105–110.
43. *Rejestr przeszczepów komórek krwiotwórczych szpiku i krwi obwodowej oraz krwi pępowinowej* (2012). Poltransplant.
44. Roewer, L. (2013). DNA fingerprinting in forensic: past, present, future. *Investigative Genetics*: 4: 22.
45. Rolf, B., Wiegand, P., Brinkmann, B. (2002). Somatic mutations at STR loci – a reason for three-allele pattern and mosaicism. *Forensic Science International*, 126(3), 200–202.
46. Rozporządzenie Ministra Sprawiedliwości z dnia 23 lutego 2005 roku w sprawie poddawania badniom lub dokonywania czynności z udziałem oskarżonego oraz osoby podejrzanej. (2005). *Dziennik Ustaw RP*, 33, poz. 299.
47. Shamshad, G. U., Ahmed, S., Bhatti, F. A., Ali, N. (2012). Mixed donor chimerism in non-malignant haematological diseases after allogeneic bone marrow transplantation. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, 22(12), 765–768.
48. Shewale, J. G., Richey, S., Sinha, S. (2000). Anomalous amplification of the amelogenin locus typed by Amp-FLSTR Profiler Plus amplification kit. *Forensic Science Communications*, 2(4).
49. Steinlechner, M., Berger, B., Niederstatter, H., Parson, W. (2002). Rare failures in the amelogenin sex test. *International Journal of Legal Medicine*, 116(2), 117–120.
50. Strand, M., Prolla, T., Liskay, R., Petes, T. D. (1993). Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*, 365, 274–276.
51. Sullivan, K., Mannuci, A., Kimpton, C. P., Gill, P. (1993). A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescent-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Bio-Techniques*, 15(4), 636–638.
52. Sun, J., Helgason, A., Masson, G., Ebenesersdóttir, S. S., Li, H., Mallick, S., Gnerre, S., Patterson, N., Kong, A., Reich, D., Stefansson, K. (2012). A direct characterization of human mutation based on microsatellites. *Nature Genetics*, 44, 1161–1165.
53. Tomilinson, I. P., Lambros, M. B., Roylance, R. R. (2002). Loss of heterozygosity analysis: practically and conceptually flawed. *Genes Chromosomes & Cancer*, 34(4), 49–353.
54. Vidal, C., Cassar, M. (2008). A case of tri-allelic pattern at locus D3S1358 on chromosome 3p21 inherited from paternal grandmother. *Forensic Science International: Genetics*, 2(4), 372–375.
55. Wegener, R., Weirich, V., Dauber, E. M., Mayr, W. R. (2006). Mother-child exclusion due to paternal uniparental disomy. *International Journal of Legal Medicine*, 120(50), 283–285.
56. Wierzbicki, P., Radych, D., Karatanowicz, D., Wypych, J., Stanisławowski, M., Dobrowolski, S., Chybicki, J., Zwolińska-Wcisło, M., Celiński, K., Korybalski, B., Smoczyński, M., Śledziński, Z., Kmieć, Z. (2009). Niestabilność mikrosatelitarna w przewlekłych zapalnych chorobach jelita grubego i w raku jelita grubego. *Annales Academiae Medicae Gedanensis*, 39(1), 163–171.

Corresponding author

Ireneusz Soltyszewski
 University of Warmia and Mazury in Olsztyn,
 Department of Criminalistics and Forensic Medicine
 ul. B. Dybowskiego 11
 PL 10-709 Olsztyn
 tel. 89 524 64 71
 e-mail: ireneusz.soltyszewski@uwm.edu.pl

WPLYW WYBRANYCH CZYNNIKÓW BIOLOGICZNYCH NA INTERPRETACJĘ PROFILI DNA (W POLIMORFICZNYCH UKŁADACH TYPU STR) W PROCESIE IDENTYFIKACJI KRYMINALISTYCZNEJ

1. Wprowadzenie

Badania polimorficznych sekwencji mikrosatelitarnych (*short tandem repeat* – STR) przy użyciu techniki PCR pozwalają na stwierdzenie, iż pomiędzy układami cech polimorficznych materiału dowodowego a referencyjnego nie występują różnice, co jest interpretowane jako silny dowód za przyjęciem hipotezy o wspólnym pochodzeniu analizowanych próbek. Technika badawcza stosowana jest w celu ustalenia pokrewieństwa pomiędzy osobami (np. udowodnienia ojcostwa), identyfikacji zwłok lub szczątków ludzkich (Roewer, 2013) oraz aby dokonać identyfikacji osobniczej. Analiza układów typu STR jest metodą dobrze poznaną (zarówno w warstwie teoretycznej, jak i praktycznej), szybką oraz wymagającą standardowego wyposażenia laboratorium genetycznego. Zastosowanie tej technologii badawczej umożliwia uzyskanie wyniku badania z niewielkiej ilości zdegradowanego materiału biologicznego zabezpieczonego w trakcie oględzin miejsca zdarzenia kryminalnego. Biorąc pod uwagę zalety oraz precyzyjnie zdefiniowane wady tej metody, uzyskane wyniki oznaczeń układów typu STR są wiarygodne i mają dla organów ścigania i wymiaru sprawiedliwości kluczowe znaczenie.

Podstawą genetyki sądowej jest założenie, że dawkami materiału biologicznego są osoby, u których profil DNA jest niezmienny oraz identyczny bez względu na rodzaj substancji biologicznej (Jeffreys, Wilson, Thein, 1985). Z badań naukowych, jak i z praktyki laboratoryjnej wynika, że istnieje jednak szereg czynników wewnętrznych (osobniczych) i zewnętrznych (środowiskowych), które oddziałując na sekwencję DNA, mogą w istotny sposób wpłynąć na interpretację uzyskanych wyników. W takich sytuacjach porównanie cech materiału dowodowego i referencyjnego może doprowadzić do sformułowania niewłaściwych wniosków, co w skrajnych przypadkach skutkuje błędnym wynikiem procesu identyfikacji (Pelotti i in., 2007).

W artykule przedstawiono wybrane czynniki biologiczne, które modyfikują profil DNA w polimorficznych układach genetycznych typu STR. Ich wybór opierał się na analizie doniesień zawartych w publikacjach z zakresu praktyki kryminalistycznej. Mimo że przedstawione zaburzenia występują rzadko, to jednak są potencjalną przyczyną błędów w obszarze interpretacji wyników badań i identyfikacji kryminalistycznej.

2. Zmienność sekwencji mikrosatelitarnych modyfikująca profile DNA

2.1. Molekularne przyczyny zmienności

2.1.1. Mutacje

Mutacje są to zmiany sekwencji kwasu deoksyrybonukleinowego organizmów, które są wywołane naturalnymi błędami podczas procesu jego replikacji, a także działaniem czynników fizycznych i chemicznych. Zmiany strukturalne w DNA powstałe w wyniku błędów replikacyjnych czy indukowane pod wpływem czynników zewnętrznych są częste i stanowią zmiany premutacyjne. Jeśli nie zostaną one usunięte podczas procesu naprawczego, mogą doprowadzić do zmian mutacyjnych po następnych cyklach replikacyjnych. Dzięki istnieniu wielopoziomowego systemu naprawczego zjawiska mutacyjne dla układów STR występują *in vivo* z częstością 3×10^3 (Kayser, de Knijff, 2011).

Istotna dla genetycznych badań kryminalistycznych w układach typu STR jest zmienność mutacyjna, która w sposób bezpośredni modyfikuje profile DNA. Zmiany w układach cech polimorficznych organizmu wywołują:

Mutacje punktowe, które dotyczą zmiany pojedynczej zasady

Pośród mutacji punktowych największe znaczenie mają: tranzycje (polegające na włączeniu przez polimerazę niekomplementarnej zasady purynowej do puryny występującej w łańcuchu matrycowym), transwersje (polegające na włączeniu niekomplementarnej zasady pirymidynowej do puryny występującej na łańcuchu matrycowym – bądź puryny do pirymidyny), delecje (polegające na utracie pojedynczej zasady), insercje (polegające na wbudowaniu dodatkowej zasady). W procesie identyfikacji osobniczej mutacje punktowe mają istotne znaczenie wtedy, gdy dotyczą regionów wiązania startów reakcji PCR. (Leibelt i in., 2003).

Większe mutacje odnoszące się do dłuższych sekwencji DNA

Z praktycznego punktu widzenia największe znaczenie mają: delecje (polegające na utracie większego fragmentu sekwencji DNA), insercje (polegające na wbudowaniu dodatkowych zasad pochodzących z innej części chromosomów), rearanżacje (polegające na zmianie po-

zycji segmentów DNA w obrębie intronów i eksonów; Brown, 2018).

Mutacje typu CNV (copy number variation/variants, zmienność/warianty liczby kopii)

Zmienność polega na zwiększeniu lub zmniejszeniu liczby kopii w segmentach DNA w porównywanych genomach. CNV mogą występować zarówno w formie delecji, jak i insercji. Większość zmienności tego rodzaju ma charakter złożonych rearanżacji będących skutkiem wielokrotnych insercji, delecji czy inwersji fragmentów genowych (Marcinkowska-Swojak, Kozłowski, 2011). Zmienność CNV przyczynia się do wystąpienia wzorów trójallelicznych lub niemych alleli (Balding, Steele, 2015).

Mutacje dynamiczne

Polegają one na zwielokrotnieniu liczby powtórzeń motywu złożonego z dwóch, trzech, czterech i – zdecydowanie rzadziej – pięciu nukleotydów w sekwencji DNA. Najbardziej prawdopodobną przyczyną powstania tego typu mutacji jest zjawisko poślizgu polimerazy podczas replikacji DNA (*polymerase slippage*). Nieprawidłowe działanie enzymu prowadzi do wydłużenia bądź skrócenia motywu repetytywnego – enzym opuszcza bądź wbudowuje pojedynczy segment w zależności od tego, czy poślizg nastąpił na nici matrycowej czy potomnej. Analiza sekwencji STR dwunukleotydowych pokazała, iż polimeraza regularnie odsuwa się podczas amplifikacji od powielanej nici. Powtórzenia trójnukleotydowe są mniej skłonne do „poślizgu” enzymu (Kashi, King, 2006), a jednostki typu tetra i penta wykazują oporność na tego typu błędy replikacyjne. Mutacje dynamiczne dotyczą zarówno regionów w genach, jak i w sekwencjach niekodujących, które charakteryzują się polimorfizmem pod względem liczby powtórzeń danego motywu.

Duże aranżacje genomowe typu disomie

Czynnikiem odpowiedzialnym za zmiany długości sekwencji STR może być zachodzący podczas mejozy proces rekombinacji DNA (*crossing-over*). W przypadku obszarów powtarzalnych dochodzi do niedokładnego sparowania homologicznych sekwencji i wymiany odcinków DNA o nierównej długości, co spowoduje wydłużenie jednego z alleli (Amos, Sawcer, Feakes, Rubinstein, 1996). W konsekwencji w profilu DNA potomka nie wystąpią niektóre z alleli obecne u matki i ojca, co nie musi świadczyć o braku pokrewieństwa (Butler, 2006).

2.1.2. Mutageny

Proces mutagenezy jest zjawiskiem naturalnym i przyczynia się do istnienia zmienności w populacjach. Jest to rzadkie zjawisko, które zachodzi jeden raz na około 10^7 wbudowywanych zasad. Częstość mutacji sponta-

nicznej wzrasta, gdy komórki są wystawione na działanie czynników fizycznych lub chemicznych.

Mutageny fizyczne

Promieniowanie jonizujące o dużej energii (promieniowanie X, γ) przyczynia się do uszkodzenia cząstek DNA, które polega na zerwaniu pojedynczej lub podwójnej nici helisy, modyfikacji zasad azotowych (purynowej lub pirymidynowej) związanych z deoksyrybozą oraz na powstaniu krzyżowych połączeń w obrębie jednej lub dwóch nici DNA oraz białek jądrowych i DNA (Hasegawa, Yoshioka, Yoshioka, 1997). Kwasy nukleinowe charakteryzują się istotną opornością na działanie tego czynnika fizycznego (Niemcunowicz-Janica i in., 2007).

Mutageny chemiczne

Mutacje są indukowane szczególnie przez związki, które strukturalnie są zbliżone do zasad znajdujących się w DNA. W wyniku nieprecyzyjnego działania polimerazy oraz ze względu na podobieństwa chemiczne zasad i ich analogów te ostatnie mogą zostać wbudowywane w sekwencję DNA podczas procesu replikacji. Powstające mutacje są rezultatem zmienionego parowania zasad.

Innym przykładem mutagenów chemicznych są związki interkalujące, które zaburzają proces replikacji DNA poprzez wnikanie pomiędzy sąsiednie pary zasad w dwuniciowej helisie. Interkalacja takiego związku chemicznego do podwójnej helisy sprawia, że sąsiednie pary zasad nieznacznie oddalają się od siebie, co powoduje zaburzenie replikacji polegające na wbudowaniu dodatkowego, pojedynczego nukleotydu w miejscu interkalacji.

2.1.3. Niestabilność mikrosatelitarna komórek nowotworowych

Jedną z cech komórek nowotworowych jest ich niestabilność genetyczna, która ujawnia się jako zmiany:

- cytogenetyczne: w postaci zwiększonej liczby złamań oraz aberracji liczbowych i strukturalnych chromosomów (niestabilność chromosomowa, *chromosomal instability – CIN*),
- molekularne: niestabilność mikrosatelitarna (*microsatellite instability – MSI*) to zmiana długości alleli powstała w wyniku zwiększenia lub zmniejszenia liczby powtórzeń nukleotydowych, niestabilność alleliczna – utrata heterozygotyczności (*loss of heterozygosity – LOH*) to delecja jednego z dwóch badanych alleli,
- epigenetyczne – niestabilność wynikająca z nieprawidłowej metylacji DNA, rearanżacji struktury chromatinu oraz zmian w budowie białek histonowych.

Problemy interpretacyjne w badaniach identyfikacyjnych najczęściej wynikają z występowania zjawiska utraty heterozygotyczności. Jest to niestabilność alleliczna, która przejawia się częściową utratą (przynajmniej 20%) jednego z alleli DNA tkanki nowotworowej, w porówna-

niu z profilem referencyjnym tej samej osoby. Aberracja powstaje w czasie replikacji lub w trakcie błędów podczas poreplikacyjnej naprawy DNA (Strand, Prolla, Liskay, Petes, 1993). Uszkodzenie systemu naprawy DNA skutkuje brakiem możliwości usuwania mutacji punktowych powstałych podczas przygotowań do podziału komórki podczas interfazy. W efekcie dochodzi do wzrostu liczby mutacji od 100 do 700 razy w porównaniu do komórek posiadających sprawny system reperacji DNA (Wierzbicki i in., 2010).

Niestabilność oznaczona zostaje poprzez analizę sekwencji mikrosatelitarnych w odniesieniu do markerów, które charakteryzują się heterozygotycznością, czyli różnią się długością sekwencji powtórzonej allelu matczynego i ojcowskiego (Tomlinson, Lambros, Roylance, 2002).

Podczas interpretacji wyników badań genetycznych należy wykazać szczególną ostrożność w przypadku, gdy dostępnym do badań materiałem są tylko preparaty histopatologiczne. Brak możliwości zweryfikowania oznaczonego profilu poprzez porównanie wyników z układem cech polimorficznych uzyskanych z innego rodzaju tkanek może doprowadzić do sformułowania błędnych wniosków. Jeśli podczas procesu transformacji nowotworowej doszło do utraty heterozygotyczności czy niestabilności sekwencji mikrosatelitarnej, możliwe jest występowanie różnych form profilu genetycznego dawcy, począwszy od układu cech odpowiadającego mieszaninie (Li, Xie, Wu, 2014) aż po odmienny genotyp (w przypadku *MSI*) lub całkowity zanik jednego z alleli (w przypadku *LOH*; Butler, 2006). Badania eksperymentalne pokazują, że częstość zjawisk typu *LOH* i *MSI* w pojedynczym locus jest na tyle wysoka, iż zjawisko to można zaobserwować w praktyce opiniowania, jednak takie zmiany w wielu loci STR są bardzo rzadkie i prawdopodobieństwo pojawienia się całkowicie odmiennego profilu genetycznego jest znikomo małe (Pepiński i in., 2009).

2.1.4. Błędy podczas podziałów komórkowych

Zaburzenia w procesie podziałów mejotycznego i mitotycznego w znaczący sposób wpływają na identyfikację kryminalistyczną. Jednym z przykładów zaburzeń w segregacji chromosomów podczas procesów podziału komórek jest disomia uniparentalna. W wyniku błędu podczas procesu podziału w diploidalnych komórkach organizmu obecne są pary chromosomów homologicznych, które pochodzą tylko od jednego zamiast od obojga rodziców (Engel, 1980). W literaturze opisano cztery mechanizmy molekularne, które wywołują ten efekt (Kotzot, Utermann, 2005).

– Pierwszy z nich dotyczy nieprawidłowości na wczesnych etapach I podziału mejotycznego. Nondysjunkcja (nierozchodzenie się chromosomów w czasie mejozy) skutkuje powstaniem gamet posiadających

dotatkowy chromosom lub gamet z brakującym chromosomem. Gdy podczas zapłodnienia taka nieprawidłowa gameta łączy się z prawidłową komórką rozrodczą pochodzącą od drugiego z rodziców, to powstanie zygota z trisomią jednej pary chromosomów. Mechanizmem obronnym powstałego organizmu jest losowa utrata jednego z chromosomów zygoty w celu zachowania stanu diploidalnego organizmu (*trisomy rescue*). Niedokładność procesu naprawczego może prowadzić do eliminacji chromosomu pochodzącego od rodzica, którego gameta była prawidłowa, i pozostawienia dwóch kopii materiału genetycznego od drugiego z rodziców (gameta niezredukowana). W konsekwencji potomek odziedziczy materiał biologiczny pochodzący tylko od jednego z rodziców.

- Drugi mechanizm dotyczy błędu w procesie gametogenezy, podczas podziału mejotycznego i segregacji materiału genetycznego w komórce rozrodczej pochodzącej od jednego z rodziców nie będzie kopii określonego chromosomu. W procesie zapłodnienia taka nieprawidłowa gameta połączy się z prawidłową komórką rozrodczą pochodzącą od drugiego z rodziców. W wyniku zapłodnienia powstanie zygota monosomiczna. Zostanie uruchomiony mechanizm naprawczy, tym razem polegający na duplikacji całego chromosomu (*monosomic rescue*). W wyniku naprawy powstanie organizm diploidalny, który posiada dwa chromosomy pochodzące tylko od jednego z rodziców.
- Trzecią przyczyną istnienia disomii uniparentalnej jest proces zapłodnienia dwiema nieprawidłowymi gametami powstałymi w wyniku nondysjunkcji. Jedna posiada dwie kopie tego samego chromosomu, druga nie posiada żadnej kopii chromosomu. W wyniku procesu zapłodnienia powstanie zygota, która będzie posiadała dwa chromosomy homologiczne, ale będą one pochodziły tylko od jednego z rodziców. Ta przyczyna disomii uniparentalnej jest bardzo rzadka, ponieważ warunkiem koniecznym jest połączenie się w procesie zapłodnienia dwóch nieprawidłowych gamet (*gamete complementation*).
- Ostatnim z katalogu błędów, które prowadzą do disomii jednorodzielskiej jest anomalia w podziale mitotycznym zygoty (bezpośrednio po procesie zapłodnienia, *postfertilization error*) polegająca na nieprawidłowym rozdzieleniu się chromatyd siostrzanych w anafazie procesu mitozy. Nondysjunkcja chromatyd siostrzanych wynikać może ze zbyt wczesnego kurczenia się pierścienia zbudowanego z mikrofilamentów. Ponadto podobny efekt może wywołać zaburzenie procesu połączenia się wrzeciona kariokinetycznego do kinetochorów chromosomu. W organizmie będą egzystowały komórki na przykład z monosomią w parze chromosomów homologicznych, które w systemie naprawczym poddane zostaną endoduplikacji.

W wyniku procesu naprawczego komórki będą miały prawidłową liczbę chromosomów, ale jedna z par zawierać będzie materiał genetyczny tylko od jednego z rodziców.

Zmienność w regionach niekodujących, które ze względu na polimorfizm są podstawą identyfikacji osobniczej, zazwyczaj nie ma wpływu na zmiany w białkach i tym samym na funkcjonowanie organizmu. Nie objawia się także widocznymi zmianami fenotypowymi. Biegły z zakresu badań genetycznych musi więc już na wstępie analizy wyników badań założyć, iż do takiego procesu mogło dojść. W przypadku ustalania pokrewieństwa nieuwzględnienie opisanych powyżej aberracji doprowadzić może do fałszywego wniosku.

3. Interpretacja wyników i wnioskowanie

Charakterystyczną cechą sekwencji mikrosatelitarnych jest ich podatność na mutacje. Oznacza to konieczność uwzględnienia losowych zmian podczas procesu identyfikacji kryminalistycznej. Zmienność mutacyjna w sekwencjach STR polega na zmianach w liczbie powtórzeń jednostki repetytywnej poprzez zwiększenie lub zmniejszenie wielkości alleli o jedno lub wiele powtórzeń (Sun i in., 2012). Możliwe jest także pojawienie się niepełnych repetycji czy mutacji punktowych (Ederveen, Lai, van Dreil, Gerats, Peters, 2015).

3.1. Mutacje dłuższych sekwencji DNA

3.1.1. Wypadanie allela Y w locus amelogeniny (delecja)

W wyniku procesu mutagenezy może wystąpić delecja fragmentu chromosomu Y mężczyzny w obrębie genu kodującego białka tworzące szkliwo zębów (Sullivan, Mannucci, Kimpton, Gill, 1993). Jak wynika z danych literaturowych, częstość tej delecji nie jest duża i wynosi w populacji austriackiej około 6 na 30 000 zbadanych mężczyzn (Steinlechner, Berger, Niederatatter, Parson, 2002). W genetycznych badaniach kryminalistycznych ta sekwencja DNA jest wykorzystywana do ustalenia płci dawcy materiału biologicznego. W przypadku delecji fragmentu DNA, do którego przyłączają się primery reakcji PCR, na obrazie elektroforetycznym nie ujawni się pik odpowiadający chromosomowi Y. W takiej sytuacji biegły może niewłaściwie oznaczyć płeć osobnika. Jest to szczególnie niebezpieczne wtedy, gdy organ procesowy zlecający badania genetyczne nie dostarczył materiału porównawczego. Błędna konkluzja w opinii, w której stwierdzono, iż z próbki materiału dowodowego wyizolowano żeński DNA i określono jego profil, może doprowadzić do ukierunkowania działalności organów ścigania na poszukiwanie kobiety jako

rzeczywistej sprawczyni czynu zabronionego. Analiza elektroforegramu może nie dać podstaw do stwierdzenia mutacji tego rodzaju. Morfologia szczytów elektroforetycznych oraz ich wysokość nie wskazują na wpływ efektów stochastycznych. W tej sytuacji niezbędna jest szczegółowa analiza wyników badania RT-PCR. Stosowanie odczynników wykrywających geny zlokalizowane na chromosomie X oraz Y pozwoli na uzyskanie informacji o płci dawcy materiału biologicznego, które powinny być skorelowane z profilem DNA. Jeśli podczas badania metodą RT-PCR wykryta została obecność genu zlokalizowanego na chromosomie Y, a na wydruku profilu DNA nie ma pik obrazującego chromosom Y w locus amelogeniny, oznacza to, że dawcą materiału biologicznego był mężczyzna. Drugim sposobem na uniknięcie błędnego oznaczenia płci jest stosowanie zestawów do reakcji PCR, w których znajduje się, oprócz markera amelogeniny, co najmniej jeden układ zlokalizowany na chromosomie Y. Dzięki temu biegły, analizując profil genetyczny, w którym nie stwierdził obecności sygnału od chromosomu Y i jednocześnie otrzymał produkt PCR w układzie polimorficznym zlokalizowanym na chromosomie Y, uzyskuje pewność, iż materiał biologiczny pochodzi od mężczyzny, a brak sygnału w pozycji Y jest wywołany mutacją.

3.2. Mutacje w miejscu wiązania starterów reakcji PCR

3.2.1. Wypadanie allela X w locus amelogeniny (tranzycja)

Jeśli zjawisko to dotyczy materiału biologicznego pochodzącego od mężczyzny, wtedy na elektroforegramie w locus amelogeniny widoczny jest jedynie allel Y. Jeśli materiał biologiczny pochodzi od kobiety, to w tym locus nie będzie widoczny sygnał produktów PCR. Nieprawidłowy układ cech polimorficznych jest skutkiem mutacji polegającej na zamianie nukleotydu C na T w sekwencji nukleotydowej przyłączania się jednego ze starterów reakcji PCR (Shewale, Richey, Sinha, 2000). Brak komplementarności powoduje, iż startery PCR nie zostaną przyłączone, co zakłóci prawidłowy przebieg reakcji amplifikacji DNA. Częstość takich zdarzeń mutacyjnych dla populacji Polski została określona na poziomie 1 na 5534 mężczyzn (Maciejewska, Pawłowski, 2009).

Kolejną przyczyną braku sygnału – allela X w locus amelogeniny – jest rzadki, ale naturalny polimorfizm populacyjny także w obrębie sekwencji przyłączania się starterów podczas reakcji PCR. Całkowite wyeliminowanie tego zjawiska nie jest możliwe pomimo tego, że zestawy odczynników do PCR zawierają dodatkowe startery reakcji o zmodyfikowanej sekwencji. Z punktu widzenia biegłego tego typu anomalie są łatwe do uchwycenia. Marker X występuje zarówno u kobiet, jak

i u mężczyzn, a więc jego brak nie spowoduje błędnej kwalifikacji płci. Po wykryciu takiego artefaktu korzystne byłoby wykonanie badania próbki z wykorzystaniem zestawu odczynników przeznaczonych do oznaczenia polimorfizmu chromosomu X.

3.2.2. Zjawisko wypadania alleli DNA w układach heterozygotycznych (delecja)

W kryminalistycznych badaniach genetycznych często obserwuje się wypadanie alleli. Wyróżnia się dwa typy tego zjawiska. Pierwszy dotyczy wypadnięcia jednego z alleli w układzie heterozygotycznym (alleliczny *drop-out*), natomiast drugi to wypadanie wszystkich alleli w określonym locus (locus *drop-out*; Butler, 2014). Głównymi przyczynami występowania tych zjawisk jest niewystarczająca ilość lub nieodpowiednia jakość materiału genetycznego. Degradacja DNA (polegająca na pocięciu fragmentów kwasów nukleinowych na krótsze odcinki) powoduje, iż dłuższe sekwencje nie są amplifikowane. Także niedostateczne stężenie DNA bądź zanieczyszczenie inhibitorami reakcji PCR przyczynia się do występowania efektów stochastycznych. Brak sygnału pochodzącego od alleli w locus może świadczyć o braku zmienności genetycznej w obrębie konserwatywnych sekwencji, do których przyłączają się startery w reakcji PCR. Substytucja nukleotydów uniemożliwi przyłączenie się starterów reakcji PCR (Butler, 2011). Doświadczony biegły na podstawie elektroforegramu jest w stanie zdefiniować przyczyny zjawiska wypadania alleli. Jeśli przyczyną jest obecność mutacji, to wtedy nie istnieje pozytywna korelacja pomiędzy długością badanego fragmentu a prawdopodobieństwem wypadania markerów. Ponadto morfologia szczytów elektroforetycznych jest prawidłowa, ich wysokości osiągają właściwe wartości, a wysokości sygnału krótkich i długich fragmentów DNA są do siebie zbliżone. Także parametry zbalansowania inter- i intralocusowe są na dopuszczalnym poziomie. Określenie przyczyny zjawiska wypadania alleli jest istotne z punktu widzenia oszacowania statystycznego otrzymanego wyniku. Jeśli jest ono wywołane zmiennością mutacyjną, a nie jakością DNA, stosowanie standardowych programów do analizy statystycznej jest niewskazane. Algorytm służący do obliczeń statystycznych zaimplementowany w tych programach zakłada, że zjawisko wypadania alleli jest wywołane efektami stochastycznymi (przypadkowymi), a nie czynnikami mutacyjnymi, których prawdopodobieństwo pojawienia się jest szacowane innymi metodami (Haned, 2011). W celu obliczenia prawdopodobieństwa hipotez alternatywnych w przypadku wypadania alleli wywołanego mutacją biegły powinien nadać temu układowi wartość neutralną (1), co oznacza, że hipotezy alternatywne są tak samo prawdopodobne.

3.3. Zmienność typu CNV

Wzór trójalleliczny w profilach DNA pochodzących od jednej osoby (duplikacja)

W praktyce kryminalistycznej pojawiają się profile DNA, w których biegli obserwują występowanie trzech alleli w jednym lub w kilku loci, jeśli analizowane markery genetyczne są ułożone na tym samym chromosomie (Freeman i in., 2006). Powielenie sekwencji DNA jest spowodowane duplikacjami fragmentu bądź całego chromosomu, delecjami, mutacjami somatycznymi czy mozaikowością (Crouse, Rogers, Amiott, Gibson, Masibay, 1999). Występowanie wzoru trójallelicznego w badaniach kryminalistycznych w opinii autorów jest niedoszacowane. W przypadku analizy jednego locus zjawisko to występuje niezwykle rzadko, lecz gdy do oznaczenia profilu DNA zostanie wykorzystany zestaw odczynników zawierających 15 polimorficznych układów genetycznych, to wzór trójalleliczny pojawia się w przybliżeniu w 1 na 1000 zbadanych próbek (Butler, 2014). Podczas analizy 5964 profili DNA w Belgii stwierdzono obecność jednego układu trójallelicznego w locus D8S1179 i dwóch w locus D18S51 (Mertens i in., 2009). Tendencja do stosowania w badaniach kryminalistycznych zestawów odczynników zawierających coraz większą liczbę polimorficznych układów STR (nawet 20) powoduje, iż zjawisko to jest obserwowane coraz częściej. Duplikacja chromosomów bądź ich części dotyczy także chromosomów płci.

Wzór trójalleliczny w próbce pobranej z materiału dowodowego istotnie może wpływać na proces wnioskowania. Próbka może zostać błędnie zakwalifikowana jako mieszanina DNA (szczególnie jeśli dodatkowy, trzeci allel pojawi się w kilku układach genetycznych). Wyróżniono dwa rodzaje wzoru trójallelicznego. W pierwszym z nich suma wysokości dwóch mniejszych szczytów elektroforetycznych DNA jest w przybliżeniu równa wartości trzeciego. W drugim typie wszystkie trzy allele charakteryzują się podobną wysokością (Clayton, Guest, Urguhart, Gill, 2004). Badania wskazują, że pierwszy rodzaj wzoru trójallelicznego jest zdecydowanie częstszy. Wzór trójalleliczny jest wynikiem dziedziczenia dwóch chromosomów bądź fragmentu drugiego chromosomu od jednego z rodziców (Rolf, Wiegand, Brinkmann, 2002). Podczas badania ojcostwa u dziecka w układzie D3S1358 uzyskano wzór trójalleliczny 17/18/19. Do porównania dostarczono próbkę materiału biologicznego pochodzącego od matki (w tym samym locus jej genotyp to 15/17) i od dziadka dziecka (od strony domniemanego ojca). W tym locus dziadek miał także wzór trójalleliczny 15/18/19. Ojciec dziecka odziedziczył po swoim ojcu układ diploidalny, który przekazał swojemu dziecku. Dodatkowo wykonano badania w innych układach polimorficznych zlokalizowanych na chromosomie trzecim i w żadnym z nich nie uzyskano wzoru trójallelicznego.

Sugeruje to, iż zjawisko CNV było spowodowane powieleniem niewielkiego fragmentu trzeciego chromosomu (Vidal, Cassar, 2008). Zjawisko występowania dodatkowego allela w praktyce laboratoryjnej jest pomijane. Gdy jest on usytuowany w pozycji stuttera, to mimo przekroczenia wartości granicznej wysokości sygnału dla tego typu artefaktu (np. 10% wysokości pików właściwego) jest często ignorowany. Biegli uznają także trzeci allel jako mniejszościowy komponent mieszaniny DNA, który ujawnił się tylko w jednym locus.

Pomimo iż biologiczny mechanizm istnienia wzoru trójallelicznego jest dobrze poznany, to jednak duże kontrowersje wzbudza metoda interpretacji rezultatu badania. Podstawą wnioskowania są dane populacyjne, jednak wyniki badań częstości występowania tego zjawiska w populacjach znacząco się od siebie różnią. Przykładem może być tutaj trójalleliczny układ 10,12,13 markera CSF1PO, który był raportowany z częstością 1 na 11 000 próbek (baza danych International Commission on Missing Persons) i 1 na 31 330 (baza danych laboratorium genetycznego w Korei Południowej; Butler, 2014). Zasadniczo zasoby ogólnokrajowych genetycznych baz danych nie obejmują profili DNA z układami trójallelicznymi. Głównie z tego powodu nie został stworzony, jak do tej pory, model obliczeń statystycznych (spełniający warunek powszechnej akceptacji środowiska naukowego) służący do oszacowania częstości profili DNA zawierających układy trójalleliczne. W opinii autorów oraz na podstawie danych zawartych w literaturze przedmiotu celowe wydaje się uwzględnianie w obliczeniach statystycznych częstości wzorów trójallelicznych (Lukka i in., 2006). W literaturze przedstawiono rodzaje wzoru trójallelicznego oraz opisano algorytm jego rozpoznawania. Również procedury dotyczące analizy mieszanin pozwalają na rozróżnienie, czy zbadana próbka materiału biologicznego jest w istocie mieszaniną czy też nie ma przekonywujących dowodów na obecność materiału biologicznego pochodzącego od dodatkowego dawcy w próbce (Gill i in., 2006). Dlatego postulowane jest wykonanie analizy uzyskanego wyniku, w którym stwierdzono wzór trójalleliczny według schematu:

- sprawdzenie poprawności przebiegu procesu badawczego poprzez analizę próbek kontroli pozytywnej i negatywnej dołączonych do cyklu badawczego,
- sprawdzenie stężenia DNA uzyskanego po procesie izolacji, poziomu inhibicji, poziomu degradacji DNA. Dane te biegły uzyskuje po wykonaniu badania metodą RT-PCR z wykorzystaniem zestawów odczynników selektywnie oznaczających płęć męską i żeńską oraz określających proporcję DNA wysokocząsteczkowego do niskocząsteczkowego. Pozyskane informacje dają podstawę do oszacowania możliwości wystąpienia zjawisk stochastycznych,
- analiza jakości uzyskanego profilu DNA (wysokość pików w RFU, morfologia szczytów elektroforetycz-

nych, obecność stutterów oraz ich wysokość w jednostkach RFU),

- analiza liczby alleli w poszczególnych loci. Jeśli pojawią się dodatkowe szczyty elektroforetyczne, to konieczne jest sprawdzenie, czy wzór trójalleliczny w profilu występuje tylko w jednym locus czy też w kilku loci ułożonych na tym samym chromosomie. Uzyskanie tych informacji pozwoli na zdefiniowanie, czy profil DNA pochodzi od jednej osoby czy też jest obrazem mieszaniny kwasu deoksyrybonukleinowego,
- oszacowanie prawdopodobieństwa zjawiska *drop-in*, czyli pojawienia się dodatkowego sygnału w profilu DNA, co polega na weryfikacji wyników badań próbek kontrolnych (zarówno kontrola pozytywna, jak i negatywna procesów izolacji i amplifikacji DNA) i wyliczeniu prawdopodobieństwa pojawienia się dodatkowego allela w odniesieniu do cyklu badawczego. Zazwyczaj wartość ta jest niewielka i nie przekracza 0,05.

Po sprawdzeniu opisanych powyżej wskaźników biegły otrzymuje informacje, na podstawie których jest w stanie stwierdzić, iż obserwowany genotyp pochodzi od jednej osoby, a dodatkowy allel nie jest artefaktem. Kontrola uzyskanego rezultatu badania materiału dowodowego z porównawczym jest ostatnim elementem weryfikacji hipotezy zakładającej, że w próbce oznaczono wzór trójalleliczny. O ile jest taka możliwość, badania próbek, w których stwierdzono wzór trójalleliczny, należy powtórzyć, wykorzystując inny zestaw odczynników do reakcji PCR.

Należy podkreślić, że nie zostały opracowane wzory służące do obliczeń częstości występowania takiego układu cech w populacji. W związku z powyższym należy zweryfikować, czy w profilu DNA znajdują się odpowiedniki alleli, jakie występują w materiale porównawczym. W przypadku uzyskania zgodności (szczególnie w układzie trójallelicznym) należy temu układowi nadać wartość „1” (wartość neutralna, nie wspiera żadnej z hipotez alternatywnych).

3.4. Disomia uniparentalna (UPD)

Niezależnie od mechanizmu molekularnego, który jest przyczyną tego zjawiska, obraz elektroforetyczny profilu DNA nie zmienia się. Biegły podczas analizy jakościowej elektroforegramu obserwuje szczyty elektroforetyczne o prawidłowej morfologii. Nie pojawiają się symptomy świadczące o obecności mieszanin DNA. Parametry profilu DNA, takie jak balans w wysokości alleli w układach heterozygotycznych w obrębie pojedynczych loci i pomiędzy układami polimorficznymi, są poprawne. Problemem, z którym styka się biegły jest dziedziczenie polimorficznych cech genetycznych niezgodnie z modelem Mendla (Kotzot, 2001). Potomek posiada układ cech

polimorficznych dokładnie taki, jak jedno z rodziców. Najczęściej segregacja cech niezgodna z prawami Mendla dotyczy tylko tych układów, które zlokalizowane są na jednym z chromosomów, co może prowadzić do błędnego wykluczenia pokrewieństwa. Pierwszym etapem procesu analizy wyniku badań genetycznych powinno być zatem sprawdzenie, czy osoba identyfikowana posiada cechy, które odziedziczyła po obojgu rodzicach. Jeśli odpowiedź na to pytanie jest negatywna, konieczne jest ustalenie przyczyny występowania różnic. W przypadku identyfikacji mężczyzny sprawdzeniem istnienia pokrewieństwa jest wykonanie badań polimorficznych układów genetycznych STR zlokalizowanych na chromosomie Y. Ze względu na szybkie tempo mutacji niektórych układów polimorficznych mogą pojawić się różnice pomiędzy haplotypami DNA ojca i syna (Kayser i in., 2000). W opisywanej sytuacji biegły ma do czynienia nie tylko z niespełnieniem założeń modelu dziedziczenia mendlowskiego, ale i różnicą w haplotypach. Stwierdzone różnice nadal nie są wystarczającymi przesłankami do wykluczenia osoby. Pomocna do ustalenia pokrewieństwa może być analiza polimorfizmu układów genetycznych zlokalizowanych na chromosomie płci X. W przypadku potomka męskiego dziedziczy on markery chromosomu X po matce. Córka dziedziczy te markery po ojcu i matce. W literaturze został opisany przypadek prawidłowej identyfikacji kryminalistycznej w sprawie spornego ojcostwa, w której zdiagnozowano zjawisko UPD zlokalizowane na chromosomie 21. W wyniku badań w polimorficznych układach genetycznych zlokalizowanych na chromosomach autosomalnych okazało się, że w układach Penta D oraz D21S11 genotyp syna był zgodny z profilem DNA matki. Potomek nie posiadał alleli dziedziczonych po ojcu. W pozostałych zbadanych polimorficznych układach genetycznych segregacja cech przebiegła zgodnie z prawami Mendla. Pojawiła się zatem wątpliwość, którą starano się rozwiązać za pomocą badań haplotypu chromosomu Y. Analiza wykazała pojedynczą różnicę alleli w układzie DYS389II pomiędzy domniemanym ojcem a synem (wynosiła ona jedną jednostkę powtarzalną). Dalsze badania potomka z wykorzystaniem markerów zlokalizowanych na chromosomie 21 wykazały, iż materiał genetyczny był dziedziczony jedynie od matki. Nasunęło to przypuszczenie istnienia zjawiska UPD 21. Niezgodność rezultatów badań układu DYS389II wyjaśniono mutacją. Dzięki dogłębnej analizie mężczyzna nie został wykluczony jako biologiczny ojciec (Mansuet-Lupo i in., 2009).

Aby uniknąć błędnego wniosku, biegły podczas ustalania pokrewieństwa powinien:

- sprawdzić, czy spełniony jest warunek prawidłowej segregacji cech polimorficznych z pokolenia rodzicielskiego na pokolenie potomne,
- jeśli zostaną stwierdzone genetyczne różnice pomiędzy dzieckiem i rodzicami, konieczne jest sprawdzenie, czy różnice te dotyczą cech zlokalizowanych na jednym czy na różnych chromosomach,
- jeśli zróżnicowanie dotyczy jedynie układów cech polimorficznych zlokalizowanych na jednym chromosomie, to biegły powinien sprawdzić, czy zaburzenie dziedziczenia cech polega na przekazaniu alleli tylko od jednego z rodziców,
- badania genetyczne w polimorficznych układach genetycznych powinny zostać powtórzone z wykorzystaniem zestawu odczynników, który zawiera inne układy genetyczne zlokalizowane na chromosomie, w stosunku do którego istnieje podejrzenie o niewłaściwym sposobie dziedziczenia,
- w przypadku identyfikacji mężczyzny wskazane byłoby wykonanie badań w polimorficznych układach genetycznych zlokalizowanych na chromosomach płci Y oraz X, w przypadku identyfikacji kobiety – badanie polimorficznych układów genetycznych zlokalizowanych na chromosomach X,
- podczas analizy statystycznej wyniku badania genetycznego z zaburzeniem modelu dziedziczenia algorytmy matematyczne służące do szacowania prawdopodobieństwa pokrewieństwa wskażą błędnie na jego brak. Nie istnieją dane populacyjne, które opisują całościowo to zjawisko. Oszacowano jedynie częstość UPD w odniesieniu do zespołu Pradera-Williego (u 25–30% pacjentów z tą chorobą przyczyną była macierzyna UPD 15) oraz zespołu Angelmana (u 2–3% pacjentów przyczyną choroby była ojcowska UPD 15; Kotzot, Utermann, 2005). Skala zjawiska w przypadku tego typu aberracji na innych chromosomach, które nie wywołują efektów fenotypowych, jak do tej pory nie jest znana. Przypadki disomii jednorodzicielskiej trzykrotnie częściej dotyczą komórek macierzynych niż ojcowskich (Bocian, 2000).

Według autorów gdy biegły wykaże, iż przyczyną zaburzenia modelu dziedziczenia mendlowskiego jest disomia jednorodzicielska, powinien on zdecydowanie rozważyć hipotezę o istnieniu pokrewieństwa. Warunkiem koniecznym do dokonania identyfikacji kryminalistycznej w oparciu o badania genetyczne jest dyskusja statystyczna uzyskanych rezultatów. Problemem, który musi rozwiązać biegły, jest nadanie wartości liczbowej dla hipotez cząstkowych odnoszących się do układów genetycznych, w których zdiagnozowano zjawisko UPD. Według autorów w obliczeniach statystycznych dla tych układów polimorficznych biegły powinien przyjąć liczbą wartość „1”. W testowaniu hipotez alternatywnych jest to wartość neutralna, która nie preferuje żadnego z założeń. Dzięki temu żadna z hipotez nie zostaje wykluczona z dalszej części analiz.

Zjawisko disomii uniparentalnej wpływa na proces ustalania pokrewieństwa (Bein, Driller, Schurmann, Schneider, Kirchner, 1998; Wegener, Weirich, Dauber, Mayr, 2006), nie ma natomiast znaczenia podczas porównywa-

nia profilu DNA materiału dowodowego z materiałem referencyjnym.

3.5. Chimeryzm komórkowy

3.5.1. Molekularne przyczyny zmienności

Allogeniczny przeszczep szpiku kostnego (od dawcy niespokrewnionego) jest procedurą, w której komórki hematopoetyczne biorcy zostają zastąpione komórkami dawcy (Jólkowska, Witt, 2004). Transplantacja szpiku prowadzi do powstania w organizmie biorcy zjawiska nazwanego chimeryzmem hematopoetycznym. W przypadku przeszczepu allogenicznego dochodzi zwykle do tzw. chimeryzmu pełnego (*complete chimerism*), kiedy w płynnej tkance stwierdza się jedynie obecność komórek dawcy. W niektórych przypadkach obserwuje się zjawisko chimeryzmu mieszanego (*mixed chimerism*), kiedy w szpiku kostnym i krwi obwodowej biorcy obecne są zarówno jego własne komórki, jak i komórki pochodzące od dawcy. Chimeryzm mieszany może mieć charakter przejściowy, kiedy po pewnym czasie po transplantacji u biorcy po dominacji komórek dawcy zaczynają dominować *de novo* jego własne komórki, chimeryzm może mieć charakter stały w sytuacji, gdy dominują komórki dawcy (Shamshad, Ahmed, Bhatti, Ali, 2012).

W tego typu sytuacjach metodą pozwalającą na wykrycie i zbadanie zjawiska chimeryzmu jest analiza markerów mikrosatelitarnych STR i minisatelitarnych (Lin i in., 2013). Istotne jest takie dobranie panelu STR, który pozwoli na odróżnienie genotypu dawcy od genotypu biorcy (Odriozola, Riancho, Colorado, Zarrabeitia, 2013). Podkreślenia wymaga fakt, że badanie krwi i wymazów pobranych z komórek nabłonka śluzówki z jamy ustnej może nie być wystarczające do ustalenia prawidłowego profilu badanej osoby (Jacewicz, Lewandowski, Rupa-Matyssek, Jędrzejczyk, Berent, 2015). Stwierdzono bowiem, że jedynie komórki otoczki cebulki włosa są materiałem pozbawionym chimeryzmu dawcy i mogą stanowić materiał referencyjny na potrzeby badań medyczno-sądowych (Dauber i in., 2004). Gdy biegły, analizując profil DNA, podejrzewa, iż osoba była poddana transplantacji szpiku, powinien zwrócić uwagę na rodzaj pobieranego materiału porównawczego. W miarę możliwości powinna zostać pobierana zarówno krew, jak i wymaz z jamy ustnej (Berger i in., 2013).

3.5.2. Interpretacja wyników badań i wnioskowanie

Z punktu widzenia biegłego z zakresu badań genetycznych największe znaczenie (ze względu na wyniki analiz genetycznych polimorfizmu) mają przeszczepy szpiku od innej osoby, zarówno spokrewnionej, jak i niespokrewnionej. W 2011 roku w Polsce dokonano 377 allogenicznych transplantacji komórek krwiotwórczych (Rejestr przeszczepów komórek krwiotwórczych szpiku

i krwi obwodowej, 2012). Wydaje się, iż liczba ta nie jest duża, a prawdopodobieństwo zetknięcia się z tym problemem podczas kryminalistycznych badań genetycznych jest niewielkie. Jednak w polskiej literaturze opisano dwa takie przypadki (Benedycka, Trynda, Wysocka, 2015; Miąskiewicz, Skonieczny, 2007), istnieje więc realny problem dotyczący sposobu interpretowania uzyskanego wyniku badania genetycznego i możliwości dokonania na jego podstawie identyfikacji kryminalistycznej. Pod względem genetycznym organizm biorcy jest chimera, co oznacza występowanie dwóch linii komórkowych: własnych oraz dawcy. Wizualizacją chimeryzmu na elektroforegramie jest pojawienie się w układach genetycznych dwóch linii komórkowych, w loci mogą znajdować się więcej niż dwa allele. Pod względem genetycznym jest to więc mieszanina DNA pochodząca od dwóch osób. Wyniki analiz dowodzą, iż po allogenicznym przeszczepie komórek krwiotwórczych z próbek krwi pobranych od biorcy ustalono jedynie profil DNA pochodzący od innej osoby – dawcy. Na elektroforegramach nie stwierdzono dodatkowych alleli. W wymazach pobranych ze śluzówki policzków stwierdzono natomiast występowanie mieszanin DNA – uwidocznione zostały linie komórkowe biorcy oraz dawcy. Profile DNA oznaczone z włosów pobranych od biorcy były zgodne z jego układem cech polimorficznych (Jacewicz i in., 2015). Taka sytuacja może mieć charakter trwały. Jak do tej pory w protokołach pobrania materiału porównawczego nie widnieje rubryka, w której dane o przeszczepie mogłyby zostać wpisane. Unormowania prawne wręcz zabraniają podawania danych objętych tajemnicą lekarską bez stosownego postanowienia sądu. Jeśli do badań genetycznych zostanie dostarczony materiał porównawczy w postaci krwi pobranej od podejrzanego o dokonanie przestępstwa (po przeszczepie allogenicznym), to biegły, oznaczając profil DNA, nie wie, że oznaczył profil DNA innej osoby niż ta, od której krew została pobrana. Niesie to za sobą szereg wątpliwości:

- Analiza porównawcza profilu genetycznego ustalonego z materiału dowodowego (w postaci krwi) zabezpieczonego na miejscu popełnienia przestępstwa z takim samym materiałem biologicznym pobranym od podejrzanego po przeszczepie allogenicznym doprowadzi do jego wykluczenia. Ryzyko błędnej identyfikacji jest duże w przypadku analiz niewyjaśnionych przestępstw sprzed kilkunastu czy kilkudziesięciu lat (do przeszczepu doszło pomiędzy dokonaniem przestępstwa a pobraniem materiału referencyjnego).
- Zgodność profili genetycznych oznaczonych z krwi (zabezpieczonej jako materiał dowodowy) i płynnej tkanki człowieka (materiał referencyjny) doprowadzi do identyfikacji dawcy komórek do przeszczepu, a nie człowieka, który pozostawił biologiczny ślad kryminalistyczny (przeszczep przed dokonaniem przestępstwa).

- Wprowadzenie profilu genetycznego dawcy komórek do przeszczepu (w przypadku badania materiału biologicznego pobranego od osoby po przeszczepie) do zbioru informacji genetycznych może doprowadzić do nieprawidłowego powiązania osoby biorcy z innymi, tożsamymi profilami genetycznymi, wprowadzonymi do bazy jako NN ślady, a pozostawionymi na miejscu przestępstwa przez dawcę komórek do przeszczepu.

Jak wskazuje praktyka laboratoryjna, w ostatnim dziesięcioleciu standardowo pobieranym materiałem referencyjnym do badań genetycznych jest wymaz ze śluzówki policzków. Wynika to nie tylko z uregulowań prawnych (Rozporządzenie Ministra Sprawiedliwości, 2005), ale i z praktyki. Na rynku dostępne są pakiety do pobierania materiału biologicznego do badań genetycznych, a procedura pobrania takiej próbki referencyjnej jest maksymalnie uproszczona. Jeśli osoba, od której pobrano materiał biologiczny w postaci wymazu ze śluzówki policzków, była leczona za pomocą przeszczepu allogenicznego, to z dużym prawdopodobieństwem z pobranego materiału porównawczego biegły uzyska mieszaninę DNA. W profilu widoczne będą linie komórkowe biorcy oraz dawcy. Mieszaninę DNA można uzyskać także wtedy, gdy doszło do kontaminacji materiału referencyjnego (błąd przedlaboratoryjny, błąd w laboratorium; Pająk, Wierchoślawski, 2013). Biegły jest więc zobowiązany do kontroli jakości przebiegu procesu badawczego w laboratorium (wykluczenie kontaminacji laboratoryjnej) oraz do powtórzenia badania, w którym powinien wykorzystać drugą wymazówkę z zestawu, aby potwierdzić prawidłowość procesu pobrania próbki biologicznej. Gdy zostaną wykluczone błędy na każdym etapie badawczym, opiniujący informuje organ procesowy o konieczności pobrania materiału porównawczego w postaci krwi i włosów. Po uzyskaniu wnioskowanych próbek wykonywane są kontrolne badania genetyczne. W ich wyniku profil DNA z próbki pobranej z krwi odpowiada profilowi dawcy komórek krwiotwórczych, natomiast układ cech polimorficznych uzyskanych z włosów jest zgodny z profilem DNA biorcy tych komórek. Z mieszaniny DNA uzyskanej z wymazu z nabłonka śluzówki policzków możliwe jest dokonanie matematycznej separacji genotypów (Clayton, Whitaker, Sparkes, Gill, 1998). Oznaczone zostają indywidualne profile DNA biorcy oraz dawcy przeszczepionych komórek z uwzględnieniem wszystkich możliwych kombinacji alleli. Korelacja uzyskanych wyników badań materiału porównawczego pozwoli na dalszy proces identyfikacji.

Kontrowersyjną sytuacją jest identyfikacja osobnicza na podstawie zabezpieczonych śladów krwawych pozostawionych na miejscu przestępstwa przez sprawcę po przeszczepie. Z kryminalistycznego punktu widzenia zgodność profili DNA materiału dowodowego i porównawczego jest bez znaczenia. W wyniku badań oznaczono bowiem profil DNA dawcy komórek krwiotwórczych

do przeszczepu, a więc innego człowieka niż rzeczywisty sprawca.

4. Wnioski

W procesie prowadzącym do wydania opinii przez biegłego należy zwracać uwagę na czynniki, które występują rzadko, ale mogą mieć kluczowe znaczenie dla prawidłowej interpretacji wyników badań. W każdej z opisanych powyżej sytuacji możliwe jest wystąpienie błędnej interpretacji wyników badań, u podłoża której leżą zmiany w materiale genetycznym dawców materiału biologicznego. Trudno jest oszacować skalę opisanych zjawisk i nie jest możliwe nawet zgrubne obliczenie prawdopodobieństwa wystąpienia takich przypadków. Nie zmienia to faktu, że wiedza dotycząca przyczyn występowania naturalnych zaburzeń, sposobów ich wykrywania oraz umiejętność interpretacji statystycznej w sytuacjach niestandardowych jest niezbędna w pracy biegłego. W związku z powyższym autorzy postulują, aby proces szkoleń realizowany w ramach systemu zarządzania uwzględniał również wyżej wymienioną problematykę. Ustawodawca w Kodeksie postępowania karnego dopuszcza możliwość uzyskania dodatkowych informacji, które są niezbędne do sporządzenia opinii. Dane o przebytych przeszczepie czy też informacje o stanie zdrowia osób, od których pobrano materiał referencyjny do identyfikacji, byłyby przydatne do sporządzenia opinii. Konieczne jest zatem powtórzenie postulatu *de lege ferenda* dotyczącego takiej zmiany uregulowań prawnych, które pozwalałyby biegłemu na uzyskanie dostępu (oczywiście w uzasadnionych przypadkach) do niektórych informacji medycznych w celu ich wykorzystania do sformułowania wniosków środka dowodowego.

