

## SNP typing metodológie vo forenznej genetike – pre a proti

**Anotácia:** Tento odborný článok sa venuje SNP (single nucleotide polymorphism) polymorfizmom, zodpovedným za variabilitu medzi dvoma jedincami, ktoré pri využívaní nových moderných technológií molekulárnej biológie predstavujú alternatívnu metódu k súčasnosti rutinne používanej STR (short tandem repeat) analýze pri individuálnej identifikácii a okrem toho sa využívajú aj pri určovaní príbuzenských vzťahov, biogeografického pôvodu a taktiež pri forenznej DNA fenotypizácii. Majú veľký význam aj pri genetickej analýze z dôkazných vzoriek obsahujúcich degradovanú DNA. V práci sme sledovali výhody a nevýhody SNP technológie pre foreznú genetiku. V závere popisujeme najnovšiu metódu, ktorá sa používa pri SNP profilizácii, ide o tzv. sekvenovanie novej generácie. Naša práca vznikla pre potreby pilotnej štúdie SNP sekvenovania vybraných markerov v spolupráci s Prírodovedeckou fakultou UK.

**Kľúčové slová:** forezná genetika, DNA analýza, SNP polymorfizmy, DNA polymorfizmy.

Neustály vývoj nových nástrojov molekulárnej biológie umožňuje forezným vedcom využívať na analýzu DNA čoraz viac techník a analyzovať tak DNA aj z dôkazných vzoriek s limitovanou kvantitou a kvalitou. Aj keď ide o vyspelé metódy, majú svoje obmedzenia, ktoré je potrebné vylepšiť, príkladom čoho môže byť zvýšená možnosť automatizácie, lepšie softvérové vybavenie, zavádzanie alternatívnych platforiem na analýzu DNA vzoriek, rýchlejšie testovanie, nižšie riziko kontaminácie, nižšia spotreba dôkaznej vzorky, redukovanie práce potrebnej na vykonanie analýzy a i.

V súčasnosti je najbežnejšou metódou STR (z angl. short tandem repeats) analýza, ktorá sa rutinne používa vo forenznych laboratóriách. Na základe toho, že pri PCR dochádza k amplifikácii zvoleného úseku DNA, sa umožnilo využívať na forezné účely aj vzorky s obsahom malého množstva DNA, čím sa znížili nároky na kvantitu biologického materiálu odobratého z miesta činu. Množstvo potrebnej DNA sa znížilo na úroveň pikogramov.

Spočiatku sa na PCR analýzu využívali skoré markery, medzi ktoré patrili HLA-DQA lokus a polymorfne markery (LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 a Gc)<sup>1</sup>, ktoré však boli nahradené STR markermi, označovanými aj ako mikrosatelity alebo SSR (z angl. Simple Sequence Repeat), ktoré sú v súčasnosti dominantne používané. Ide o úseky DNA, zložené z niekoľkých po sebe sa opakujúcich tandemových repetícií, skladajúcich sa z 2–6 bázových párov. Počet opakovaní je medzi jedincami vysoko variabilný, vďaka čomu sú STR markery efektívne pre individuálnu identifikáciu. Požadovaná dĺžka amplikónov je 150–450 bp<sup>2</sup>, čo znemožňuje analýzu degradovanej DNA, avšak so zavedením mini-STR, pri ktorých je dĺžka amplikónov 71–250 bp<sup>3</sup>, sa tento problém čiastočne vyriešil.

FBI (z angl. Federal Bureau of Investigation) používa od roku 1997 štandardný set 13 špecifických STR lokusov, súhrne označovaných ako CODIS (Combined DNA Index System) markery, medzi ktoré patria: TPOX, D3S1358, D5S818, FGA, CSF1PO, D7S820, D8S1179, TH01, VWA, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11 a okrem toho ešte pohlavie určujúci lokus pre amelogenín AMEL-X/Y.<sup>4</sup>

---

<sup>1</sup> BUDOWLE, B., LINDSEY, J. A., DECOU, J. A., KOONS, B. W., GIUSTI, A. M., COMEY, C. T., 1995, Validation and population studies of the loci LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 and Gc (PM loci), and HLA-DQ $\alpha$  using a multiplex amplification and typing procedure. *J. Forensic Sci.* 40: 45-54.

<sup>2</sup> GILL, P., 2002, Role of short tandem repeat DNA in forensic casework in the UK – past, present, and future perspectives. *Biotechniques.* 32: 366-368,370,372.

<sup>3</sup> MULERO, J. J., CHANG, C. W., LAGACÉ, R. E., WANG, D. Y., BAS, J. L., MCMAHON, T. P., HENNESSY, L. K., 2008, Development and validation of the AmpFISRT® MiniFiler™ PCR Amplification Kit: A MiniSTR multiplex for the analysis of degraded and/or PCR inhibited DNA. *J. Forensic Sci.* 53 (4): 838-852.

<sup>4</sup> BUTLER, J. M., 2006, Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J. Forensic Sci.* 51: 253-265.

Európska sieť forenzných inštitútov (ENFSI – European Network of Forensic Science Institutes) a Rada Európskej únie odporúčajú pre analýzu DNA európsky štandardný set (ESS), ktorý obsahuje sedem lokusov: D3S1358, FGA, D8S1179, TH01, VWA, D18S51 a D21S11.<sup>5</sup> Veľká Británia a väčšina Európy využíva SGMPLUS profil (z angl. second-generation multiplex plus profile), pozostávajúci z ôsmich lokusov z CODIS štandardného setu (FGA, TH01, VWA, D3S1358, D8S1179, D16S539, D18S51 a D19S433), súčasne s dvoma prídavnými markermi D2S1338 a D19S433 a s lokusom pre amelogenín.<sup>6</sup> Pre robustnú multiplexnú amplifikáciu základných STR lokusov je dostupných mnoho komerčných kitov, napr. PowerPlex 16 kit (Promega Corporation), 16plex AmpFISTR Identifier kit (Life Technologies), Y-filer™ kit.

Na vylepšenie diskriminačnej sily a zlepšenie efektívnosti analýzy degradovanej DNA, ENFSI a EDNAP (z angl. European DNA Profiling Group) zverejnila v roku 2005 zoznam troch prídavných nových mini-STR lokusov: D2S441, D10S1248 a D22S1045 ako aj dve polymorfne lokusy D1S1656 a D12S391.<sup>7</sup> Na základe toho boli vyvinuté nové kity PowerPlex® ESX 17 a ESI 17 Systems (Promega company), AmpFISTR® NGM™ PCR Amplification Kit (NGM) (Life Technologies).

Napriek všetkým výhodám, vďaka ktorým sa STR analýza stala každodenne používanou metódou vo forenzných laboratóriách po celom svete, má táto metóda aj určité obmedzenia. Problémom môže byť testovanie vzorky, ktorá obsahuje čiastočný profil pre degradovanú DNA; alebo ak bol prvostupňový príbuzný pravého otca nevedome testovaný (ako napr. brat alebo otec); vytvorenie nejednoznačného vzoru genotypu vďaka relatívne vysokej mutačnej nestabilite STR v porovnaní s ostatnými polymorfnými markermi; a testovanie príbuznosti, ak je väčšina alebo všetci príbuzní nedostupní na testovanie.<sup>8</sup> Je preto nevyhnutné vyvinúť nové metódy, presahujúce STR markery, aby bolo možné posunúť hranice foreznej genetiky. Jedným z možných adeptov sú SNP polymorfizmy.

Potenciál SNP profilizácie spočíva v početnom zastúpení SNP v ľudskom genóme, prospešnosti pri analýze degradovaných DNA vzorkách a prístupnosti na automatizáciu. Pri analýze je dôležité vybrať vhodné SNP markery, ktorých vlastnosti sa líšia a závisia od spôsobu použitia, na ktoré sú určené.

### **SNP (*Single-nucleotide polymorphism* - jednonukleotidový polymorfizmus)**

SNP sú substitúcie jedného nukleotidu v sekvencii genómu. SNP variácia nastane, ak sa jeden nukleotid, napr. A (adenín) nahradí jedným z troch ďalších nukleotidov – C (cytozín), G (guanín) alebo T (tymin) (obr.1). O SNP môžeme hovoriť, ak sa na tom istom mieste v genóme nachádza rozdielny nukleotid u viac ako 1 % populácie. SNP, ktoré sú zodpovedné za 90 % ľudskej variability, sa objavujú každých 100 až 300 báz spomedzi 3 miliárd báz genómu.

---

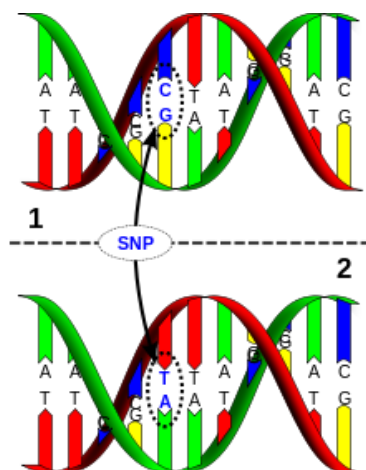
<sup>5</sup> Promega Corporation, Expansion of the European Standard Set of DNA Database Loci – the Current Situation. Schneider, P. M., 2009. [online]. [cit. 10-3-2013]. Dostupné na internete:

<http://worldwide.promega.com/~media/files/resources/profiles%20in%20dna/1201/expansion%20of%20the%20european%20standard%20set.pdf?la=en>

<sup>6</sup> BUTLER, J. M., 2006, Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J Forensic Sci.* 51: 253-265.

<sup>7</sup> GILL, P., FEREDAY, L., MORLING, N., SCHNEIDER, P.M., 2006, The evolution of DNA databases – recommendations for new European STR loci. *Forensic Sci Int.* 156: 242-244; HILL, C. R., DUEWER, D. L., KLINE, M. C., SPRECHER, C. J., MCLAREN, R. S., et al., 2011, Concordance and population studies along with stutter and peak height ratio analysis for the PowerPlex® ESX 17 and ESI 17 Systems. *Forensic Sci Int Genet.* 5: 269-275.

<sup>8</sup> PHILLIPS, C., GARCÍA-MAGARIÑOS, M., SALAS, A., CARRACEDO, Á., LAREU, M. V., 2012, SNPs as Supplements in Simple Kinship Analysis or as Core Markers in Distant Pairwise Relationship Tests: When Do SNPs Add Value or Replace Well-Established and Powerful STR Tests? *Transfus Med Hemother.* 39: 202-210.



Obr. 1: SNP. Na obrázku je znázornený jednonukleotidový polymorfizmus, následkom ktorého došlo medzi DNA molekulou 1 a DNA molekulou 2 k zámene nukleotidu v jednom básovom páre (v tomto prípade ide o C/T polymorfizmus)<sup>9</sup>.

SNP sa môže vyskytovať v kódujúcej alebo, ako je to vo väčšine prípadov, v nekódujúcej medzigénovej oblasti. Hoci je 99 % ľudskej DNA sekvencie rovnakej, variácie v DNA sekvencii môžu mať veľký vplyv na individuálnu reakciu ľudí na ochorenia, chemikálie, environmentálne faktory, akými sú baktérie, vírusy, toxíny. Vďaka tomu je SNP vhodným na biomedicínsky výskum, vývoj nových farmaceutických produktov alebo pri diagnostike ochorení.<sup>10</sup>

SNP sú genetické markery, ktoré majú potenciálne využitie aj vo forenznej oblasti. Ukazujú sa užitočné, a to hlavne pri prípadoch, kde sa profilizácia robí zo vzorky obsahujúcej málo templátovej DNA alebo z degradovaných vzoriek, čo je časté pri identifikácii obetí hromadných nešťastí. Všetky forenzne DNA ukazovatele, hlavne DNA databáza, sú založené na STR markeroch, a preto je nepravdepodobné, že v blízkej budúcnosti sa SNP stanú primárnymi foreznými markermi.

### Výhody a nevýhody SNP

Poprednou výhodou SNP je, že PCR produkty SNP polymorfizmov môžu byť fragmenty s dĺžkou menšou ako 60 – 80 bp.<sup>11</sup> Preto pri práci s vysoko degradovaným biologickým materiálom môžeme získať použitím SNP analýzy lepšie výsledky ako pri STR profilizácii, ktorá vyžaduje podstatne dlhšie fragmenty. Pri použití mini-STR sa veľkosť amplikónov pohybuje od 71 do 250 bp.<sup>12</sup>

Ďalšou výhodou je možnosť úplnej automatizácie a vytvorenie multiplexného testovania, ktoré zodpovedá schopnosti simultánne analyzovať niekoľko genetických markerov počas jedného testovania, čo je pri DNA profilizácii kľúčové. Analýza viacerých markerov súčasne znižuje spotrebu často limitovanej forenznej dôkaznej vzorky. Je to veľmi

<sup>9</sup> upravené podľa Wikipedia©2013. Single-nucleotide Polymorphism. [online]. [cit.20-2-2013]. Dostupné na internete: <<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/2e/Dna-SNP.svg/220px-Dna-NP.svg.png>>

<sup>10</sup> U.S. Department of Energy Genome Programs. 2008. SNP Fact Sheet. [online]. 2008. [cit. 20-2-2013 ]. Dostupné na internete: [http://www.ornl.gov/sci/rechresources/Human\\_Genome/faq/snps.shtml](http://www.ornl.gov/sci/rechresources/Human_Genome/faq/snps.shtml).

<sup>11</sup> DIVNE, A. M., ALLEN, M., 2005, A DNA microarray system for forensic SNP analysis. *Forens.Sci Int.* 154 : 111-121.

<sup>12</sup> MULERO, J. J., CHANG, C. W., LAGACÉ, R. E., WANG, D. Y., BAS, J. L., MCMAHON, T. P., HENNESSY, L. K., 2008, Development and validation of the AmpFISRT® MiniFiler™ PCR Amplification Kit: A MiniSTR multiplex for the analysis of degraded and/or PCR inhibited DNA. *J Forensic Sci.* 53 (4): 838-852.

prospešné v určitých prípadoch, ak je žiadané opätovné pretestovanie. Navyše, keďže sa so vzorkou počas len jednej analýzy menej manipuluje, znižuje sa riziko možnej kontaminácie v rámci laboratória.<sup>13</sup>

SNP majú nízku mutačnú rýchlosť, vďaka čomu vystupujú ako stabilné genetické markery pre analýzy príbuznosti, čo sa využíva v prípadoch dedičnosti, prípadoch nezvestných osôb a taktiež ak nie je dostupný žiadny priamy referenčný materiál.<sup>14</sup> S vhodne zvolenými SNP markermi je možné určiť etnický pôvod vzorky alebo určité fyzické atribúty.<sup>15</sup>

Hlavnou nevýhodou je, že väčšina SNP je bialelických. To znamená, že v genóme sa na danom mieste môžu vyskytovať dve alely, čiže môžeme dostať tri genotypy. Napríklad – ak alelami pre SNP lokus sú A a B, tak tri možné genotypy sú AA, BB alebo AB. V porovnaní s STR analýzou, pri ktorej sa používa 13 základných STR lokusov, sú preto menej informatívne. A na dosiahnutie približne rovnakej sily diskriminácie potrebujeme použiť až 50 – 100 autozomálnych SNP lokusov, čo značne zvyšuje náklady.<sup>16</sup> Problémom pri DNA analýze, na ktorú použijeme SNP typizáciu, môže byť neschopnosť súčasne amplifikovať dostatok SNP v robustnom multiplexnom teste zo vzorky s nízkym obsahom DNA.

Medzi potenciálne forenzné markery na genetickú analýzu sa však zaraďujú aj trialelické SNP. Prostredníctvom pyrosekvenovania a SNaPshot metódy sa vybralo 20 spomedzi trialelických SNP dostupných v NCBI databáze, ktoré môžu byť použité na doplnkovú individuálnu identifikáciu (určenie pôvodcu) a testovanie paternity.<sup>17</sup>

Pre obmedzený počet aliel na lokus je pri SNP problematická interpretácia v prípadoch zahŕňajúcich zmes rôznych DNA (tzv. zmiešané stopy), čiže ak vzorka pochádza od viacerých darcov. Je ťažké určiť rozdiel medzi vzorkou obsahujúcou dvoch homozygotov alebo homozygota a heterozygota. Ďalšou nevýhodou je, že nízka mutačná rýchlosť, ktorá je zaradená aj ako výhoda, pretože prispieva k subštruktúrnemu efektu v populácii. To znamená, že jednotlivé subpopulácie tvoriace celkovú populáciu sú medzi sebou geneticky vysoko variabilné, ale v rámci určitej subpopulácie je variabilita nulová.<sup>18</sup> Na účely testovania identity je preto nevyhnutný rozvážnejší výber SNP.

### **Rozdelenie SNP do kategórií podľa ich využitia vo forenznej genetike**

Využitie polymorfizmov jedného nukleotidu vo forenznej genetike je v rutinnej praxi možné v prípadoch individuálnej identifikácie a testovania príbuznosti.<sup>19</sup> Okrem toho boli realizované aplikácie SNP pri analýze mtDNA a určovaní príbuzenských vzťahov pomocou Y chromozómu, charakterizácii vysoko degradovaných DNA vzoriek, migračnej analýze či analýze biogeografického pôvodu jedinca, doplnkovej individuálnej identifikácii alebo

---

<sup>13</sup> BUDOWLE, B., VAN DAAL, A., 2009, Extracting evidence from forensic DNA analyses: future molecular biology directions. *BioTechniques*. 46 (5): 339-350.

<sup>14</sup> BUDOWLE, B., VAN DAAL, A., 2008, Forensically relevant SNP classes. *Biotechniques*. 44 (5): 603-610

<sup>15</sup> BUTLER, J.M., 2005, Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers, druhé vydanie, Burlington, London: Elsevier Academic Press, 2005, 181-200, ISBN 0-12-147952-8.

<sup>16</sup> CHAKRABORTY, R., STIVERS, D.N., SU, B., ZHONG, Y., BUDOWLE, B., 1999, The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: implications for development of new DNA typing systems. *Electrophoresis*. 20 (8): 1682-1696

<sup>17</sup> ZHA, L., YUN, L., CHEN, P., LUO, H., YAN, J., HOU, Y., 2012, Exploring of tri-allelic SNPs using Pyrosequencing and the SNaPshot methods for forensic application. *Electrophoresis*. 33: 841-848.

<sup>18</sup> NORRGARD, K., SCHULTZ, J., 2008, Using SNP data to examine human phenotypic differences. *Nature Education*. 1 (1).

<sup>19</sup> BÖRSTING, C., ROCKENBAUER, E., MORLING, N., 2009, Validation of a single nucleotide polymorphism (SNP) typing assay with 49 SNPs for forensic genetic testing in a laboratory accredited according to the ISO 17025 standard. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (1): 32-42.

potenciálnom určení fyzických črt. Na základe toho, na aký účel sa SNP používajú, bolo zavedené rozdelenie SNP do štyroch skupín.<sup>20</sup>

### ***SNP na testovanie identity***

SNP na individuálnu identifikáciu (určenie pôvodcu) majú rovnakú úlohu ako vybrané STR markery používané vo forenznej genetike. Poskytujú genetickú informáciu s vysokou diskriminačnou silou, ktorá môže vyvrátiť alebo dokázať, či je jedinec zdrojom dôkazného biologického materiálu z miesta činu. Taktiež sa používajú pri nejednoznačných prípadoch, ak sa testuje, či je domnelý člen s rodinou skutočne v príbuzenskom vzťahu. Pri výbere SNP markerov vhodných na forezné účely hrá rozhodujúcu úlohu najmä heterozygotita (pravdepodobnosť, že náhodne vybraný jedinec je na danom lokuse heterozygot) a hodnota  $F_{st}$  (miera diferenciácie populácie na základe genetickej štruktúry).

Problémom pri jednonukleotidových polymorfizmoch je, že frekvencia každej alely sa môže pohybovať v rozmedzí od nuly k jednej medzi rôznymi populáciami, čo spôsobuje veľmi veľkú závislosť pravdepodobnosti zhody dvoch profilov od frekvencií v populácii použitých na testovanie. Je preto nevyhnutné presne poznať početnosť polymorfizmov v príslušnej populácii.

Na forezné účely sú vhodné tie SNP polymorfizmy, ktoré majú vysokú heterozygotitu a v podstate identickú alelickú frekvenciu vo všetkých populáciách. Pravdepodobnosť zhody tak bude takmer konštantná bez ohľadu na to, v akej populácii sa analýza uskutočnila. Vysoká heterozygotita maximalizuje informatívnosť každého SNP a nízka  $F_{st}$  hodnota minimalizuje náhodný výskyt alely v rôznych populáciách. Kombinácia vysokej heterozygotity a nízkej  $F_{st}$  teda zvyšuje účinnosť forezného panela pri profilizácii, čo znamená, že bude potrebných menej SNP na dosiahnutie pravdepodobnosti zhody v požadovanej miere, než ako by bolo potrebných pri použití náhodne zvolených SNP.<sup>21</sup>

Európske forezné laboratória validovali 21 SNP panel<sup>22</sup>, 52 SNP panel a 49 SNP panel<sup>23</sup>.

### ***SNP informujúce o príbuznosti***

Vo forenznej praxi sa SNP informujúce o príbuznosti väčšinou používajú pri genetickej analýze v prípadoch identifikácie nezvestných osôb, neidentifikovaných ľudských pozostatkov alebo obetí hromadných nešťastí. Úspešná identifikácia genetickým testovaním pomocou príbuzenskej analýzy je obmedzená množstvom DNA dostupnej na analýzu, počtom rodinných príslušníkov potrebných na porovnanie a vhodnými genetickými markermi.

Na maternálne dedenom genóme mtDNA a paternálne dedenej nerekombinujúcej oblasti Y chromozómu boli identifikované SNP informujúce o príbuznosti osôb. Miera rekombinácie a nízka mutačná rýchlosť sú rozhodujúce faktory pri výbere SNP markerov, ktoré umožňujú evolučné štúdie a analýzu príbuznosti, a to hlavne v prípadoch, keď je referenčná vzorka a dôkazná vzorka oddelená niekoľkými generáciami.

---

<sup>20</sup> BUDOWLE, B., VAN DAAL, A., 2008, Forensically relevant SNP classes. *Biotechniques*. 44 (5): 603-610.

<sup>21</sup> KIDD, K. K., PAKSTIS, A. J., SPEED, W.C., GRIGORENKO, E. L., KAJUNA, S. L. B., et al., 2006, Developing a SNP panel for forensic identification of individuals. *Forensic Sci.Int.* 164 (1): 20-32.

<sup>22</sup> DIXON, L. A., MURRAY, C. M., ARCHER, E. J., DOBBINS, A. E., KOUMI, P., GILL, P., 2005, Validation of a 21-locus autosomal SNP multiplex for forensic identification purposes. *Forensic Sci. Int.* 154(1):62-77.

<sup>23</sup> BØRSTING, C., ROCKENBAUER, E., MORLING, N., 2009, Validation of a single nucleotide polymorphism (SNP) typing assay with 49 SNPs for forensic genetic testing in a laboratory accredited according to the ISO 17025 standard. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (1): 32-42; SANCHEZ, J.J., PHILLIPS, C., BØRSTING, C., BALOGH, K., BOGUS, M., et al. 2006, A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis*. 27 (9): 1713-1724.

Vzhľadom na nedostatok rekombinácií môže byť mtDNA analyzovaná ako jeden vysoko informatívny multialelický lokus (haplotyp). To spolu s maternálnym typom dedičnosti umožňuje použitie mtDNA akéhokoľvek maternálne príbuzného jedinca ako referenčnej vzorky pri individuálnej identifikácii.<sup>24</sup> Na základe dohody sa zaznamenal len zoznam rozdielov z univerzálnej referenčnej sekvencie, označovanej ako Cambridge alebo Andersonova sekvencia.<sup>25</sup>

Veľkou výhodou využitia mtDNA na forenzné účely je vysoká sekvenčná variácia, ktorá vyplýva z vysokej mutačnej rýchlosti v mitochondriálnom genóme. mtDNA je v porovnaní s jadrovou DNA desaťkrát viac náchylnejšia na mutáciu. Dva hypervariabilné segmenty kontrolnej oblasti, HVSI a HVSII, sú najvariabilnejšie medzi jedincami, čo ich robí vhodnými na forenzné účely. Rutinné vyšetrowanie je založené na určení rozličných sekvencií mtDNA v kontrolnej oblasti. Ak sa mtDNA profil získaný z dôkaznej vzorky zhoduje s profilom získaným z referenčnej vzorky, štatistická interpretácia významu zhody závisí od frekvencie dotyčného haplotypu v populácii.<sup>26</sup> Ak je jeho výskyt vzácny, tak pravdepodobnosť, že dve vzorky majúce tento haplotyp sú získané z rovnakej maternálnej línie, je vysoká a dôkaz získaný takouto cestou má vysokú diskriminačnú silu.<sup>27</sup> V európskej populácii, kde asi 7 % populácie predstavuje najbežnejší HVSI/HVSII typ, je štandardná sekvenčná analýza kontrolnej oblasti pre forenznú diskrimináciu nedostačujúca. S cieľom vylepšiť diskriminačnú silu boli analyzované SNP nachádzajúce sa v kódujúcej oblasti mtDNA, ktorá je evolučne stabilnejšia<sup>28</sup>. V dôsledku rastúceho počtu kompletne sekvenovaných genómov mtDNA bolo vydané veľké množstvo SNP, ktoré sa využívajú napr. na rozlíšenie populácie východnej Eurázie od západnej Eurázie. Niektoré z panelov boli optimalizované a úspešne aplikované vo forenzných laboratóriách.<sup>29</sup>

Markery na analýzu príbuznosti, ktoré sú v lokusoch mtDNA a Y-chromozómu, majú obmedzenú diskriminačnú silu. Bol preto vytvorený nový typ forenzných DNA markerov, nazývaných haplobloky. Patil *et al.* (2001)<sup>30</sup> definovali haplobloky ako oblasti s veľkým podielom spoločne odvodených haplotypov. Gabriel *et al.* (2002)<sup>31</sup> ich opísal na základe väzbovej nerovnováhy, ktorá dosahuje veľké hodnoty medzi párami SNP v rámci jedného

---

<sup>24</sup> CARRACEDO, A., BÄR, W., LINCOLN, P., MAYR, W., MORLING, N. et al., 2000, DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci. Int.* 110 (2): 79-85.

<sup>25</sup> ISENBERG, A. R., MOORE, J.M., 1999, Mitochondrial DNA analysis at the FBI Laboratory. *Forensic Sci. Commun.* 1:2.

<sup>26</sup> PARSON, W., BANDELT, H.J., 2007, Extended guidelines for mtDNA typing of population data in forensic science. *Forensic Sci. Int. Genet.* 1 (1): 13-19.

<sup>27</sup> SALAS, A., BANDELT, H. J., MACAULAY, V., RICHARDS, M. B., 2007, Phylogeographic investigations: the role of trees in forensic genetics. *Forensic Sci. Int.* 168 (1):1-13.

<sup>28</sup> COBLE, M. D., JUST, R. S., O'CALLAGHAN, J. E., LETMANYI, I. H., PETERSON, C. T., IRWIN, J. A., PARSONS, T. J., 2004, SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS OVER THE ENTIRE MTDNA GENOME THAT INCREASE THE POWER OF forensic testing in Caucasians. *Int. J. Legal. Med.* 118 (3):137-146; COBLE, M. D., VALLONE, P. M., JUST, R. S., DIEGOLI, T. M., SMITH, B. C., PARSONS, T. J., 2006, Effective strategies for forensic analysis in the mitochondrial DNA coding region. *Int. J. Legal. Med.* 120 (1):27-32.

<sup>29</sup> BRANDSTÄTTER, A., PARSONS, T.J., PARSON, W., 2003, Rapid screening of mtDNA coding region SNPs for the identification of west European Caucasian haplogroups. *Int. J. Legal. Med.* 117 (5):291-298; DACA, P., MIELNIK, M., ROGALLA, U., SKONIECZNA, K., LINKOWSKA, K., GRZYBOWSKI, T., 2008, The application of minisequencing reactions for haplogroup assignment of mitochondrial DNA. *Arch. Med. Sadowej. Kryminol.* 58 (4):212-217.

<sup>30</sup> PATIL, N., BERNO, A.J., HINDS, D. A., BARRETT, W. A., DOSHI, J. M., et al., 2001, Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21. *Science.* 294:1719-1723.

<sup>31</sup> GABRIEL, S.B., SCHAFFNER, S.F., NGUYEN, H., MOORE, J.M., ROY, J., et al., 2002, The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296:2225-2229.

haplobloku. Wang *et al.* (2002)<sup>32</sup> určili ako ďalšie kritérium, že v haploblokoch nesmela nastať žiadna historická rekombinácia. Ako celok má haploblok vyššiu diskriminačnú silu pre príbuzenskú analýzu ako jednotlivé SNP v bloku. Kumulatívna diskriminačná sila bola v populačných štúdiách stanovená na hodnotu  $10^{-12}$ . Spomedzi 253 identifikovaných haploblokov bolo na základe Hardy-Weinbergovej rovnováhy, vysokej väzbovej nerovnováhy, vysokej heterozygotity, nízkej  $F_{st}$  hodnoty a minimálneho počtu SNP na definíciu haplobloku vybratých 24 kandidátov slúžiacich na forenzné účely.<sup>33</sup>

### ***SNP informujúce o pôvode***

V praktických forenzných prípadoch sa stretávame so situáciami, keď nie je možné určiť pôvodcu biologického materiálu a s pomocou operatívnych metód ani vytipovať páchatel'a skutku. V niektorých prípadoch nie je žiaden podozrivý ani potom, ako je STR profil dôkaznej vzorky porovnávaný s DNA databázou páchatel'ov alebo informácia o skutočnom páchatel'ovi nie je hodnoverná, napr. pri niektorých výpovediach očitých svedkov. Pre vedenie vyšetrovania môže byť užitočné, ak je známe niečo o zovňajšku páchatel'a. Biogeografický pôvod jedinca môže nepriamo poskytnúť niektoré neúplne informácie o celkovom vzhľade osoby, a tak poskytnúť oporný bod pre vedené vyšetrovanie. Forenzné STR lokusy sú efektívne markery pri individuálnej identifikácii, avšak sú nevyhovujúce pri definovaní genetického biogeografického pôvodu jedinca pre vysoký stupeň frekvencie alely v populácii. Y chromozóm a mtDNA haplotypy sú používané na rekonštrukciu evolučnej histórie a z toho možno odvodiť dáta o genetickom pôvode jedinca. Avšak uniparentálna dedičnosť a obmedzené zastúpenie v ľudskom genóme nerobia tieto genetické markery vhodnými na nepriamy odhad fenotypu.

Markery informujúce o pôvode (AIM – z angl. ancestry informative markers) predstavujú SNP rozptýlené v celom ľudskom genóme, vyskytujúce sa v značne rozdielnej alelovej frekvencii medzi svetovými populáciami, sú teda na tento účel použiteľné a umožňujú odhadnúť biogeografický pôvod analyzovanej vzorky<sup>34</sup>. Môžu odhaliť zdedený pôvod dôkaznej vzorky alebo osoby, ale neanalyzujú sa na získanie fyzických znakov.

Táto nepriama metóda posudzovania fenotypu je založená na korelácii prejaveneho fenotypu s určitými štruktúrnymi prvkami pôvodu ľudskej populácie. Príkladom je pigmentácia kože, ktorá je svetlejšia u obyvateľ'ov severnej Európy ako u akejkoľvek inej populácie. S vhodnými databázami definujúcimi merania pigmentácie kože v regionálnych a rôznych svetových referenčných pôvodných populáciách môžeme z dôkaznej vzorky geneticky stanovenú svetlú pigmentáciu kože severoeurópskeho darcu určiť z presne stanoveného genómového pôvodu. Táto metóda vyžaduje stanovenie genetickej variácie, ktorá silno koreluje so špecifickými populáciami, a vytvorenie databáz so zavedením špecifických AIM.

Úspešné určenie pôvodu vyžaduje genotypizáciu veľkého počtu AIM, pričom sa väčšinou využíva technológia založená na mikročipoch. V súčasnosti dostupné panely AIM

---

<sup>32</sup> WANG, N., AKEY, J. M., ZHANG, K., CHAKRABORTY, R., JIN, J., 2002, Distribution of recombination crossovers and the origin of haplotype blocks: the interplay of population history, recombination, and mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 71 (5):1227–1234.

<sup>33</sup> GE, J., BUDOWLE, B., PLANZ, J. V., CHAKRABORTY, R., 2010, Haplotype block: new type of forensic DNA markers. *Int. J. Legal. Med.* 124 (5):353-361.

<sup>34</sup> FRUDAKIS, T., VENKATESWARLU, K., THOMAS, M.J., GASKIN, Z., GINJUPALLI, S., et al., 2003, A classifier for the SNP-based inference of ancestry. *J. Forensic Sci.* 48 (4):771–782; NASSIR, R., KOSOY, R., TIAN, C., WHITE, P. A., BUTLER, L. M., et al, 2009, An ancestry informative marker set for determining continental origin: validation and extension using human genome diversity panels. *BMC Genet.* 10:39

SNP<sup>35</sup> umožňujú určenie kontinentálnych rozdielov a hodnoty vzťahujúce sa na miešanie rás medzi niektorými populáciami. Je však ešte potrebné pridať určité panely, aby sa docielilo spoľahlivé odlišenie jedincov pochádzajúcich z rôznych populácií vnútri kontinentu.<sup>36</sup>

### ***SNP informujúce o fenotype***

Vo forenznej genetike sa rozvíja nová oblasť, tzv. forezná DNA fenotypizácia alebo tiež „DNA intelligence“, ktorá využíva molekulárne DNA markery na určenie EVC (viditeľné črty zovňajška z angl. externally visible characteristics), ako sú napr. pigmentácia, farba očí, výška alebo rysy tváre, z DNA variabilných dát získaných z dôkazového materiálu odobratého z miesta činu alebo z pozostatkov nezvestných osôb.<sup>37</sup> Základný postup pri priamej metóde určovania fenotypu spočíva v identifikácii SNP vnútri génovej oblasti asociovaných s konkrétnymi črtami.

Najrelevantnejšími prípadmi pre foreznú DNA fenotypizáciu sú tie, pri ktorých sa profil získaný analýzou dôkaznej DNA vzorky nezhoduje s konvenčným STR profilom podozrivého a nezhoduje sa ani so žiadnym profilom v DNA databáze a nie sú dostupné žiadne doplňujúce informácie o donorovi danej vzorky. Určenie EVC je taktiež opodstatnené v prípadoch, ak sú k dispozícii očití svedkovia, ale ich výpovede týkajúce sa vzhľadu neznámeho páchatel'a je potrebné potvrdiť. Túto metódu môžeme využiť aj pri identifikácii obetí hromadného nešťastia a v iných prípadoch identifikácie nezvestných osôb, ak konvenčná DNA profilizácia v podobe STR profilu nepreukáže zhodu so žiadnym zdanlivo príbuzným jedincom a zlyhá pri poskytnutí informatívnej stopy. Využíva sa tiež v prípadoch nezvestných osôb, ak sa nájde telo v pokročilom štádiu rozkladu, alebo časti tela, ktoré nevykazujú EVC, ako sú napríklad kosti<sup>38</sup>.

V súčasnosti sa na foreznú DNA fenotypizáciu používa robustný a citlivý IrisPlex, ktorý bol validovaný pre forezné použitie. Vyvinutie multiplexného genotypizujúceho systému založeného na v súčasnosti šiestich najinformatívnejších SNP o farbe očí umožňuje predpovedanie modrej a hnedej farby dúhovky s vysokou presnosťou predikcie, až 94 %, stanovenej pri testovaní viac ako 3800 jedincov z Európy.<sup>39</sup> Optimálne množstvo DNA potrebnej na presnú predikciu farby očí predstavuje 0,25 až 0,5 ng templátovej DNA. Vysokú citlivosť potvrdzuje, že úplný profil sa získa už pri použití 31 pg DNA, čo je ekvivalentné obsahu šiestich ľudských diploidných buniek. Dĺžka PCR fragmentov bola navrhnutá do veľkosti 80 – 128 bp, čo ho robí vhodným na analýzu vzoriek obsahujúcich fragmentovanú DNA dôsledkom degradácie. Multiplexná assay je založená na metóde SNaPshot a kapilárnej elektroforéze, ktoré sa bežne používajú vo forezných laboratóriách.

HIrisPlex systém je schopný simultánne určiť farbu očí aj farbu vlasov v jednom multiplexnom teste, ktorý je navrhnutý tak, aby si poradil s malým množstvom DNA, čo umožňuje analýzu vzoriek obsahujúcich degradovanú DNA. Dĺžka PCR fragmentov bola menšia ako 160 bp. Panel obsahuje 1 indel a 23 SNP markerov, z ktorých šesť sa využíva pri určovaní farby očí (sú totožné s markermi IrisPlexu) a zvyšné na predikciu farby vlasov.

---

<sup>35</sup> 73 AIM DNAWitness kit biogeografického pôvodu, 320 AIM euroázijský panel, 1476 AIM európsky panel, citované v Budowle, B., van Daal, A., 2008, Forensically relevant SNP classes. *Biotechniques*. 44 (5): 603-610.

<sup>36</sup> BUDOWLE, B., VAN DAAL, A., 2008, Forensically relevant SNP classes. *Biotechniques*. 44 (5): 603-610; Decorte, R., 2010, Genetic identification in the 21st century—current status and future developments. *Forensic Sci. Int.* 201(1-3):160-164.

<sup>37</sup> KAYSER, M., KNIJFF, P., 2011, Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat. Rev. Genet.* 12 (3):179-192

<sup>38</sup> WALSH, S., LIU, F., BALLANTYNE, K.N., VAN OVEN, M., LAO, O., KAYSER, M., 2011, IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. *Forensic Sci. Int. Genet.* 5 (3):170-180.

<sup>39</sup> WALSH, S., WOLLSTEIN, A., LIU, F., CHAKRAVARTHY, U., RAHU, M., et al., 2012, DNA-based eye colour prediction across Europe with the IrisPlex system. *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 (3):330-340.



Vysoká citlivosť bola preukázaná získaním kompletného DNA profilu pri vstupnej vzorke s veľkosťou 63 pg.<sup>40</sup>

Použitie HirisPlexu pri analýze DNA zo zuba poľského generála Władysława Sikorskeho (1881 až 1943) a 23 kompletných profilov z 26 DNA analyzovaných vzoriek odobratých z kostí sa osvedčilo pri správnom určení farby očí a vlasov, o ktorej záznamy sa dochovali z hodnoverných zdrojov. Potvrdilo sa opodstatnenie použitia HirisPlexu ako dostatočne citlivého a robustného nástroja na predikciu farby očí a vlasov z kostrových pozostatkov. Je preto vysoko pravdepodobné rutinné používanie HirisPlexu pri forenzných prípadoch týkajúcich sa kostrových pozostatkov alebo starodávnej DNA.<sup>41</sup>

### **Nová generácia sekvenačných technológií (Next-generation sequencing)**

Vysoká úroveň multiplexnej genetickej profilizácie má osobitný význam napr. v prípadoch individuálnej identifikácie obetí hromadných nešťastí, kde je cieľom analyzovať veľké množstvo informatívnych markerov z obmedzeného množstva genetického materiálu. Najvyšší stupeň multiplexnej analýzy je reprezentovaný celogenómovým prístupom, ktorý umožňuje simultánnu analýzu veľkého množstva genetických markerov bez potreby ich anotácie. Nedávny pokrok v oblasti vysokovýkonných technológií umožnil dosiahnuť neobvyklú úroveň cenovo prístupnej automatizácie a multiplexnej genómovej sekvenačnej analýzy. Vývoj technológií ďalej umožnil, aby sekvenačná analýza využívala ako templát jednu molekulu. Takýto vývoj otvoril nové oblasti pre forezné aplikácie.<sup>42</sup>

Nová generácia sekvenačných technológií (NGS, z angl. Next-generation sequencing) umožňuje simultánnu analýzu stoviek lokusov alebo dokonca celého genómu, a to bez toho, aby bola závislá od anotácie genómu. Pri NGS sa produkujú masívne paralelné sekvenačné dáta, v niektorých prípadoch je to viac ako miliarda sekvencií krátkych fragmentov DNA pri jednom cykle.<sup>43</sup> Klonovanie či amplifikácia templátu DNA fragmentov, ktoré sú sekvenované, je plne automatizovaná a úzko prepojená s procesom stanovenia sekvencie. NGS poskytuje zvýšený rozsah zobrazenia sekvenačného rozsahu, čo vedie k vyššej presnosti čítania a umožňuje odvodiť počet kópií analyzovaných segmentov.<sup>44</sup>

### **Záver**

Vo forenznej komunite púťali na seba SNP polymorfizmy v poslednej dekáde veľa pozornosti, čo podnietilo mnohé výskumy, ktoré sa v súčasnosti týkajú týchto markerov a odкрývajú informácie o etnickom pôvode, fyzických charakteristikách, molekulárnej patológii atď. Bolo dokázané, že pri individuálnej identifikácii a testovaní príbuznosti sú SNP hodnotné

---

<sup>40</sup> WALSH, S., LIU, F., WOLLSTEIN, A., KOVATSI, L., RALF, A., KOSINIAK-KAMYSZ, A., BRANICKI, W., KAYSER, M., 2013, The HirisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Sci. Int. Genet.* 7 (1):98-115.

<sup>41</sup> DRAUS-BARINI, J., WALSH, S., POŚPIECH, E., KUPIEC, T., GŁĄB, H., BRANICKI, W., KAYSER, M., 2013, Bona fide colour: DNA prediction of human eye and hair colour from ancient and contemporary skeletal remains. *Investig. Genet.* 4 (1):3.

<sup>42</sup> ZIĘTKIEWICZ, E., WITT, M., DACA, P., ŻEBRACKA-GALA, J., GONIEWICZ, M., JARZĄB, B., WITT, M., 2012, Current genetic methodologies in the identification of disaster victims and in forensic analysis. *J. Appl. Genet.* 53 (1):41-60.

<sup>43</sup> TUCKER, T., MARRA, M., FRIEDMAN, J.M., 2009, Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *Am. J. Hum. Genet.* 85 (2):142-154; LI, R., LI, Y., FANG, X., YANG, H., WANG, J., KRISTIANSEN, K., WANG, J., 2009, SNP detection for massively parallel whole-genome resequencing. *Genome Res.* 19 (6):1124-1132; HARISMENDY, O., NG, P.C., STRAUSBERG, R.L., WANG, X., STOCKWELL, T.B., et al., 2009, Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. *Genome Biol.* 10 (3):R32.

<sup>44</sup> TUCKER, T., MARRA, M., FRIEDMAN, J.M., 2009, Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *Am. J. Hum. Genet.* 85 (2):142-154.

makery, a v niektorých laboratóriách sú rutinne používané pri vyšetovaní forenzných prípadov. SNP sa však používajú hlavne ako doplnkové markery, no sú situácie, pri ktorých môžu byť najlepšou možnou voľbou. Ak je DNA v dôkaznej vzorke veľmi degradovaná, je oveľa väčšia šanca získať výsledky s použitím SNP markerov, ako keby sa použili STR markery, pretože SNP môžu byť amplifikované vo veľmi krátkych amplicónoch. Navyše nezrovnalosti spôsobené mutáciou v SNP lokusoch sú extrémne zriedkavé, zatiaľ čo pri STR lokusoch sú pomerne časté. Pri SNP markeroch dochádza k mutáciám stotisíc krát zriedkavejšie ako pri STR markeroch.

SNP markery umožnili vznik novej éry, tzv. foreznej DNA fenotypizácii, ktorá umožňuje určiť fyzický vzhľad jednotlivca priamo na základe biologického materiálu nájdeného na mieste činu. V princípe to môže kriminalistom pomôcť vo vyšetovaní, a to tým, že budú schopní redukovať veľký počet potenciálnych podozrivých, ak sú páchatelia neznámi. Týka sa to prípadov, ak sa profil získaný konvenčnou STR analýzou nezhodoval so žiadnym vo foreznej DNA databáze, ak sa nezískala zhoda s profilom podozrivého vybraného na základe policajného vyšetovania, alebo v prípadoch, kde jednoducho STR profil nemôžeme vygenerovať, a to z dôvodu nízkej kvality a/alebo kvantity DNA vzorky.

Na SNP profilizáciu bolo vynájdené veľké množstvo metód, ktoré vznikli rozličnou kombináciou jedného zo štyroch základných mechanizmov reakcie alelickej diskriminácie s rôznymi detekčnými metódami. Každá metóda má svoje výhody a je vhodná na určitý typ DNA analýzy. Najnovšiu metódu SNP profilizácie predstavuje sekvenovanie novej generácie, ktorého použitie závisí od jeho prístupnosti, čo závisí od prijateľnej ceny vynaloženej za analýzu v porovnaní s ostatnými dostupnými metódami.

**Pod'akovanie:** Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti bezpečnostného výskumu kód ITMS: 26240120034, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

### Literatúra

BØRSTING, C., ROCKENBAUER, E., MORLING, N., 2009, Validation of a single nucleotide polymorphism (SNP) typing assay with 49 SNPs for forensic genetic testing in a laboratory accredited according to the ISO 17025 standard. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (1): 32-42.

BØRSTING, C., ROCKENBAUER, E., MORLING, N., 2009, Validation of a single nucleotide polymorphism (SNP) typing assay with 49 SNPs for forensic genetic testing in a laboratory accredited according to the ISO 17025 standard. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (1): 32-42.

BRANDSTÄTTER, A., PARSONS, T.J., PARSON, W., 2003, Rapid screening of mtDNA coding region SNPs for the identification of west European Caucasian haplogroups. *Int. J. Legal. Med.* 117 (5):291–298.

BUDOWLE, B., LINDSEY, J.A., DECOU, J. A., KOONS, B.W., GIUSTI, A. M., COMEY, C. T., 1995, Validation and population studies of the loci LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 and Gc (PM loci), and HLA-DQ $\alpha$  using a multiplex amplification and typing procedure. *J.Forensic Sci.* 40: 45-54.

BUDOWLE, B., VAN DAAL, A., 2008, Forensically relevant SNP classes. *Biotechniques.* 44 (5): 603-610

BUDOWLE, B., VAN DAAL, A., 2008, Forensically relevant SNP classes. *Biotechniques.* 44 (5): 603-610.

- BUDOWLE, B., VAN DAAL, A., 2008, Forensically relevant SNP classes. *Biotechniques*. 44 (5): 603-610; Decorte, R., 2010, Genetic identification in the 21st century—current status and future developments. *Forensic Sci. Int.* 201(1-3):160–164
- BUDOWLE, B., VAN DAAL, A., 2009, Extracting evidence from forensic DNA analyses: future molecular biology directions. *BioTechniques*. 46 (5): 339-350
- BUTLER, J. M., 2005, *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*, druhé vydání, Burlington, London: Elsevier Academic Press, 2005, 181-200, ISBN 0-12-147952-8.
- BUTLER, J.M., 2006, Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J Forensic Sci.* 51: 253-265
- BUTLER, J.M., 2006, Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J Forensic Sci.* 51: 253-265.
- CARRACEDO, A., BÄR, W., LINCOLN, P., MAYR, W., MORLING, N. et al., 2000, DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci. Int.* 110 (2): 79-85.
- COBLE, M.D., JUST, R. S., O'CALLAGHAN, J. E., LETMANYI, I. H., PETERSON, C. T., IRWIN, J. A., PARSONS, T. J., 2004, Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *Int. J. Legal. Med.* 118 (3):137–146.
- COBLE, M. D., VALLONE, P. M., JUST, R. S., DIEGOLI, T., SMITH, B. C., PARSONS, T. J., 2006, Effective strategies for forensic analysis in the mitochondrial DNA coding region. *Int. J. Legal. Med.* 120 (1):27–32.
- DACA, P., MIELNIK, M., ROGALLA, U., SKONIECZNA, K., LINKOWSKA, K., GRZYBOWSKI, T., 2008, The application of minisequencing reactions for haplogroup assignment of mitochondrial DNA. *Arch. Med. Sadowej. Kryminol.* 58 (4):212–217.
- DIVNE, A. M., ALLEN, M., 2005, A DNA microarray system for forensic SNP analysis. *Forens.Sci Int.* 154 : 111-121.
- DIXON, L. A., MURRAY, C. M., ARCHER, E. J., DOBBINS, A. E., KOUMI, P., GILL, P., 2005, Validation of a 21-locus autosomal SNP multiplex for forensic identification purposes. *Forensic Sci.*
- DRAUS-BARINI, J., WALSH, S., POŚPIECH, E., KUPIEC, T., GŁĄB, H., BRANICKI, W., KAYSER, M., 2013, Bona fide colour: DNA prediction of human eye and hair colour from ancient and contemporary skeletal remains. *Investig. Genet.* 4 (1):3.
- FRUDAKIS, T., VENKATESWARLU, K., THOMAS, M. J., GASKIN, Z., GINJUPALLI, S., et al., 2003, A classifier for the SNP-based inference of ancestry. *J. Forensic Sci.* 48 (4):771–782.
- GABRIEL, S. B., SCHAFFNER, S. F., NGUYEN, H., MOORE, J. M., ROY, J., et al., 2002, The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296:2225–2229.
- GE, J., BUDOWLE, B., PLANZ, J.V., CHAKRABORTY, R., 2010, Haplotype block: new type of forensic DNA markers. *Int. J. Legal. Med.* 124 (5):353-361.
- GILL, P., 2002, Role of short tandem repeat DNA in forensic casework in the UK – past, present, and future perspectives. *Biotechniques*. 32: 366-368,370,372
- GILL, P., FEREDAY, L., MORLING, N., SCHNEIDER, P.M., 2006, The evolution of DNA databases – recommendations for new European STR loci. *Forensic Sci Int.* 156: 242-244.

- HARISMENDY, O., NG, P. C., STRAUSBERG, R. L., WANG, X., STOCKWELL, T. B., et al., 2009, Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. *Genome Biol.* 10 (3):R32
- HILL, C. R., DUEWER, D. L., KLINE, M. C., SPRECHER, C. J., MCLAREN, R. S., et al., 2011, Concordance and population studies along with stutter and peak height ratio analysis for the PowerPlex® ESX 17 and ESI 17 Systems. *Forensic Sci Int Genet.* 5: 269-275
- CHAKRABORTY, R., STIVERS, D. N., SU, B., ZHONG, Y., BUDOWLE, B., 1999, The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: implications for development of new DNA typing systems. *Electrophoresis.* 20 (8): 1682-1696.
- ISENBERG, A. R., MOORE, J. M., 1999, Mitochondrial DNA analysis at the FBI Laboratory. *Forensic Sci. Commun.* 1:2
- KAYSER, M., KNIJFF, P., 2011, Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat. Rev. Genet.* 12 (3):179-192.
- KIDD, K. K., PAKSTIS, A. J., SPEED, W. C., GRIGORENKO, E. L., KAJUNA, S. L. B., et al., 2006, Developing a SNP panel for forensic identification of individuals. *Forensic Sci.Int.* 164 (1): 20-32.
- LI, R., LI, Y., FANG, X., YANG, H., WANG, J., KRISTIANSEN, K., WANG, J., 2009, SNP detection for massively parallel whole-genome resequencing. *Genome Res.* 19 (6):1124–1132.
- MULERO, J. J., CHANG, C. W., LAGACÉ, R. E., WANG, D. Y., BAS, J. L., MCMAHON, T. P., HENNESSY, L. K., 2008, Development and validation of the AmpFISRT® MiniFiler™ PCR Amplification Kit: A MiniSTR multiplex for the analysis of degraded and/or PCR inhibited DNA. *J Forensic Sci.* 53 (4): 838-852.
- MULERO, J. J., CHANG, C. W., LAGACÉ, R. E., WANG, D. Y., BAS, J. L., MCMAHON, T. P., HENNESSY, L. K., 2008, Development and validation of the AmpFISRT® MiniFiler™ PCR Amplification Kit: A MiniSTR multiplex for the analysis of degraded and/or PCR inhibited DNA. *J Forensic Sci.* 53 (4): 838-852.
- NASSIR, R., KOSOY, R., TIAN, C., WHITE, P. A., BUTLER, L. M., et al, 2009, An ancestry informative marker set for determining continental origin: validation and extension using human genome diversity panels. *BMC Genet.* 10:39.
- NORRGARD, K., SCHULTZ, J., 2008, Using SNP data to examine human phenotypic differences. *Nature Education.* 1 (1).
- PARSON, W., BANDEL, H. J., 2007, Extended guidelines for mtDNA typing of population data in forensic science. *Forensic Sci. Int. Genet.* 1 (1): 13-19.
- PATIL, N., BERNO, A.J., HINDS, D. A., BARRETT, W. A., DOSHI, J. M., et al., 2001, Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21. *Science.* 294:1719–1723.
- PHILLIPS, C., GARCÍA-MAGARIÑOS, M., SALAS, A., CARRACEDO, Á., LAREU, M. V., 2012, SNPs as Supplements in Simple Kinship Analysis or as Core Markers in Distant Pairwise Relationship Tests: When Do SNPs Add Value or Replace Well-Established and Powerful STR Tests? *Transfus Med Hemother.* 39: 202-210.
- Promega Corporation, Expansion of the European Standard Set of DNA Database Loci – the Current Situation. Schneider, P. M., 2009. [online]. [cit. 10-3-2013]. Dostupné na internete: <http://worldwide.promega.com/~media/files/resources/profiles%20in%20dna/1201/expansion%20of%20the%20european%20standard%20set.pdf?la=en>.

- SALAS, A., BANDELT, H.J., MACAULAY, V., RICHARDS, M. B., 2007, Phylogeographic investigations: the role of trees in forensic genetics. *Forensic Sci. Int.* 168 (1):1–13
- SANCHEZ, J. J., PHILLIPS, C., BØRSTING, C., BALOGH, K., BOGUS, M., et al. 2006, A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis*. 27 (9): 1713-1724
- TUCKER, T., MARRA, M., FRIEDMAN, J.M., 2009, Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *Am. J. Hum. Genet.* 85 (2):142–154
- TUCKER, T., MARRA, M., FRIEDMAN, J. M., 2009, Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *Am. J. Hum. Genet.* 85 (2):142–154
- U.S. Department of Energy Genome Programs. 2008. SNP Fact Sheet. [online]. 2008. [cit. 20-2-2013 ]. Dostupné na internete: [http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/faq/snps.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/faq/snps.shtml).
- WALSH, S., LIU, F., BALLANTYNE, K. N., VAN OVEN, M., LAO, O., KAYSER, M., 2011, IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. *Forensic Sci. Int. Genet.* 5 (3):170-180.
- WALSH, S., LIU, F., WOLLSTEIN, A., KOVATSI, L., RALF, A., KOSINIAK-KAMYSZ, A., BRANICKI, W., KAYSER, M., 2013, The HirisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Sci. Int. Genet.* 7 (1):98-115.
- WALSH, S., WOLLSTEIN, A., LIU, F., CHAKRAVARTHY, U., RAHU, M., et al., 2012, DNA-based eye colour prediction across Europe with the IrisPlex system. *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 (3):330-340.
- WANG, N., AKEY, J. M., ZHANG, K., CHAKRABORTY, R., JIN, J., 2002, Distribution of recombination crossovers and the origin of haplotype blocks: the interplay of population history, recombination, and mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 71 (5):1227–1234.
- Wikipedia® . 2013. Single-nucleotide Polymorphism. [online]. [cit.20-2-2013]. Dostupné na internete: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/2e/Dna-SNP.svg/220px-Dna-SNP.svg.png>.
- ZHA, L., YUN, L., CHEN, P., LUO, H., YAN, J., HOU, Y., 2012, Exploring of tri-allelic SNPs using Pyrosequencing and the SNaPshot methods for forensic application. *Electrophoresis*. 33: 841-848.
- ZIĘTKIEWICZ, E., WITT, M., DACA, P., ŻEBRACKA-GALA, J., GONIEWICZ, M., JARZĄB, B., WITT, M., 2012, Current genetic methodologies in the identification of disaster victims and in forensic analysis. *J. Appl. Genet.* 53 (1):41-60.
- 73 AIM DNAWitness kit biogeografického pôvodu, 320 AIM euroázijský panel, 1476 AIM európsky panel, citované v Budowle, B., van Daal, A., 2008, Forensically relevant SNP classes. *Biotechniques*. 44 (5): 603-610.

**Key words:** forensic genetics, DNA analysis, SNPs (single nucleotide polymorphisms), DNA polymorphisms.

### Summary

SNP typing methodologies in forensic genetics - advantages and disadvantages: This study is concerned with SNPs (single nucleotide polymorphisms), which are responsible for variability between two individuals, and with utilizing new modern technologies of molecular

biology represent an alternative method to the current routine used STR (short tandem repeat) analysis for individual identification. Furthermore they are also used in determining family relationships, biogeographical origin and in forensic DNA phenotyping. They are also very important for the genetic analysis of evidence samples containing degraded DNA. This study moreover deals with methodologies that are currently used in SNP profiling. Utilized technologies are based on different types of allelic discrimination reactions, assay formats and detection methods. SNP profiling utilize one of the four major molecular mechanisms of allelic discrimination: allele specific hybridization, primer extension, allele specific oligonucleotide ligation and allele specific invasive cleavage. They are two categories related to the form of analysis, and homogeneous reactions and solid phase. The products of these reactions can be detected by various methods, that giving rise to variety and different types of SNP profiling. The latest method used for SNP profiling is next generation sequencing.

*kpt. RNDr. Barbara Sviežená, PhD.  
Oddelenie biológie a genetickej analýzy  
Kriminalistického a expertízneho ústavu PZ  
Bratislava  
e-mail: barbara.sviezena@minv.sk, kl. 57324;*

*mjr. Mgr. Andrej Choma, PhD.  
Oddelenie biológie a genetickej analýzy  
Kriminalistického a expertízneho ústavu PZ  
Bratislava  
e-mail: andrej.choma@minv.sk, kl. 57324;*

*Bc. Patrícia Žižkovičová  
Katedra genetiky Prírodovedeckej fakulty UK,  
Bratislava*

Recenzenti: Ing. Eduard Sivčo, RNDr. Regina Sepšiová, PhD.