



Praca poglądowa
Review paper

Sanaa M. Aly^{1,2}, Dalia M. Sabri²

Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS): „złote narzędzie” w arsenale metod kryminalistycznych Next generation sequencing (NGS): a golden tool in forensic toolkit

¹Zakład Medycyny Sądowej i Toksykologii, Uniwersytet Suez Canal, Ismailia, Egipt

²Centrum Badań Biotechnologicznych, Uniwersytet Suez Canal, Ismailia, Egipt

¹Forensic Medicine and Clinical Toxicology Department, Faculty of Medicine, Suez Canal University, Egypt

²Biotechnology Research Center, Suez Canal University, Egypt

Streszczenie

Analiza DNA stanowi fundament współczesnych nauk kryminalistycznych. Technologie sekwencjonowania DNA są skutecznymi narzędziami, które przyczyniają się do rozwoju nauk molekularnych. Dotychczas główną techniką sekwencjonowania była metoda Sangera. Dziś coraz większego znaczenia w naukach kryminalistycznych nabiera tzw. sekwencjonowanie nowej generacji (NGS). Metoda ta umożliwia rozwój i rozszerzenie zastosowań metod molekularnych w naukach kryminalistycznych dzięki eliminacji pułapek, które wiążą się z konwencjonalnymi metodami sekwencjonowania. Głównymi zaletami NGS w porównaniu z metodą konwencjonalną jest jednoczesne wykorzystywanie dużej liczby markerów genetycznych o wysokiej rozdzielczości danych genetycznych. Przyczyni się to niewątpliwie do rozwiązania kilku istotnych problemów, takich jak analiza mieszanin i badanie znikomych ilości materiału dla zdegradowanych próbek. Na bazie nowych technologii możliwa jest analiza wielu markerów w celu określenia istotnych cech biologicznych, np. wieku, pochodzenia geograficznego, typu tkanek i zewnętrznych cech fizycznych oraz identyfikacji bliźniąt monozygotycznych. Możliwe jest również uzyskanie danych dotyczących mikroorganizmów, owadów, roślin i gleby, które mają bardzo istotne znaczenie dla celów medyczo-sądowych. Mimo wielu badań z wykorzystaniem NGS dla celów sądowych rutynowe stosowanie tej technologii w sprawach kryminalistycznych wymaga jeszcze spełnienia określonych wymogów. Z tego względu niezbędne są dalsze badania analizujące efektywność zastosowania tych technik. W tym kontekście w niniejszej pracy omówiono najważniejsze zastosowania NGS w naukach kryminalistycznych w erze masowego sekwencjonowania równoległego.

Słowa kluczowe: sekwencjonowanie nowej generacji, nauki kryminalistyczne, sekwencjonowanie metodą Sangera.

Abstract

The DNA analysis is a cornerstone in contemporary forensic sciences. DNA sequencing technologies are powerful tools that enrich molecular sciences in the past based on Sanger sequencing and continue to glowing these sciences based on Next generation sequencing (NGS). Next generation sequencing has excellent potential to flourish and increase the molecular applications in forensic sciences by jumping over the pitfalls of the conventional method of sequencing. The main advantages of NGS compared to conventional method that it utilizes simultaneously a large number of genetic markers with high-resolution of genetic data. These advantages will help in solving several challenges such as mixture analysis and dealing with minute degraded samples. Based on these new technologies, many markers could be examined to get important biological data such as age, geographical origins, tissue type determination, external visible traits and monozygotic twins identification. It also could get data related to microbes, insects, plants and soil which are of great medico-legal

importance. Despite the dozens of forensic research involving NGS, there are requirements before using this technology routinely in forensic cases. Thus, there is a great need to more studies that address robustness of these techniques. Therefore, this work highlights the applications of forensic sciences in the era of massively parallel sequencing.

Key words: next generation sequencing, forensic sciences, Sanger sequencing.

Wstęp

Sekwencjonowanie DNA od dawna opiera się na metodzie Sangera. Analiza DNA do celów kryminalistycznych rozwija się przede wszystkim dzięki opracowywaniu nowych technologii. Do aktualnie dostępnego panelu można dodawać nowe markery informacyjne, poprawiając w ten sposób siłę dyskryminacyjną i dokładność analiz. Nowe możliwości w tym zakresie mogą przynieść technologie sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Po pierwsze, NGS jest bardziej wydajna, co pozwala skrócić czas oczekiwania na wyniki analizy DNA w laboratoriach kryminalistycznych. Po drugie, analiza równoległa w NGS może znacznie podnieść wydajność i siłę dyskryminacyjną. Po trzecie, aspekt klonalny NGS może się przyczynić do dalszego postępu, np. wyższej czułości przy analizie próbek mieszanin, która zazwyczaj wiąże się z wieloma wyzwaniami. I wreszcie, obniżenie kosztów i wielkości urządzeń umożliwi sekwencjonowanie całego genomu przy zastosowaniu stacjonarnego sekwencjatora genomowego MiSeq/Illumina, który wykorzystuje technologię sekwencjonowania przez syntezę [1]. Zrewolucjonizuje to analizę DNA do celów kryminalistycznych. Dokonane ostatnio znaczące postępy w technologii sekwencjonowania umożliwiły wiele nowych zastosowań. W ramach niniejszego przeglądu opisano wykorzystanie NGS w kryminalistyce. Praca stanowi tym samym krótki przewodnik poświęcony przyszłości teorii i praktyki kryminalistycznej.

Krótkie powtórzenia tandemowe

Standardową metodą wykorzystywaną w kryminalistyce jest profilowanie metodą krótkich powtórzeń tandemowych (STR). Niezależnie od ogromnego postępu, jaki dokonał się w tej technologii, w niektórych badaniach kryminalistycznych profilowanie na podstawie układów STR nadal wiąże się z istotnymi wyzwaniami [2]. Tradycyjna elektroforeza kapilarna (EK)

Introduction

Studies for long time depend mainly on sequencing DNA based on Sanger sequencing. Forensic DNA analysis is developing owing to development of new technologies. New informative markers could be added to existing panel to improve discrimination power and accuracy. Next generation sequencing technologies (NGS) can bring new offers. Firstly, throughput is higher which help in decreasing DNA backlog in forensic laboratories. Secondly, parallel analysis in NGS can greatly improve the throughput and discrimination power. Thirdly, the clonal aspect of NGS can lead to more advancement such as higher sensitivity for mixture samples which considered as a challenge during analysis. Lastly, with decreasing the cost and size of equipment, it will become possible to do whole genome sequencing on a MiSeq/Illumina (bench-top DNA sequencer) which based on the sequencing-by-synthesis technology [1]. That will revolutionize the field of forensic DNA analysis. Recently, the great advances of sequencing technologies have supported a lot of new applications. Therefore, this review will discuss the applications of NGS in forensic sciences as a simplified guide for future forensics studies and practice.

Short tandem repeats

The forensic standard method is STRs profiling. In spite of great progress in technology, there are important challenges associated with STRs profiling still present in some forensic investigations [2]. Traditional capillary electrophoresis (CE) relies on DNA fragment size detection. So that alleles of similar length but of different sequences cannot be discriminated. Thus, traditional CE-based STR analysis often cannot resolve complex paternity

opiera się na oznaczaniu wielkości fragmentów DNA. Oznacza to brak możliwości rozróżnienia alleli o zbliżonej długości, lecz odmiennych sekwencjach. Tym samym tradycyjna analiza STR wykorzystująca EK często nie sprawdza się w złożonych przypadkach dochodzenia ojcostwa na podstawie mutacji STR [3]. Wiele trudności w badaniach kryminalistycznych sprawia analiza mieszanin zawierających DNA pochodzące od więcej niż jednej osoby. Wykonywane dziś analizy próbek zawierających mieszane DNA charakteryzują się zazwyczaj niskimi współczynnikami detekcji [4].

W wielu badaniach wykorzystywano różne systemy sekwencjonowania przy wykrywaniu *loci* STR na chromosomach autosomalnych i płciowych w ramach tej samej analizy. W większości *loci* wyniki genotypowania były stabilne i wiarygodne. Dzięki technologii NGS rozwiązany zostanie problem rozróżniania alleli o zbliżonej długości. Usprawni to identyfikację próbek mieszanych i w wielu przypadkach znacząco zoptymalizuje koszty oraz efektywność postępowania prawnego [3].

Chociaż standardowe typowanie metodą STR w większości zastosowań zapewnia wystarczającą siłę dyskryminacyjną, sekwencjonowanie na dużą skalę pozwoliło osiągnąć znaczące postępy w analizach kryminalistycznych [3]. Przykładowo, sekwencjonowanie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) wokół i w obrębie markerów STR może zwiększyć siłę dowodową przy ustalaniu pokrewieństwa [5].

Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu

Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu polegają na zmianie (substytucji lub insercji/delecji) pojedynczej zasady w obrębie genomu i odpowiadają za większą część zmienności genetycznej występującej u ludzi. Wyróżnia się cztery grupy SNP: umożliwiające identyfikację, śledzenie pochodzenia, przodków i dostarczające informacji o fenotypie [6]. Ułatwiają one prowadzenie dochodzeń w sprawach karnych w aspekcie identyfikacji przestępcy bez materiału referencyjnego [3]. Przy wielu cechach (np. kolor skóry, oczu i włosów) współczynnik dokładności sięga 80–90%. Nieco niższą wartość współczynnika odnotowuje się przy predykcji wzrostu [5]. W takich przypadkach sekwencjonowanie całogenomowe wykorzystujące NGS umożliwi uzyskanie większej liczby bardziej szczegółowych informacji [3].

Zastąpienie STR przez SNP mogłoby przynieść wymierne korzyści, ponieważ wiele technicznych

cases based on STR mutations [3]. The analysis of DNA mixtures in which DNA derived from more than one person is a great challenge in forensic analysis. Low detection rates are often associated with mixed DNA samples in contemporary analyses [4].

Many studies used different sequencing system in detecting STR *loci* on both autosomal and sexual chromosomes in the same analysis. The genotyping were stable and reliable in most *locus*. The main challenge that could be solved based on NGS technology is the ability to discriminate alleles which have similar length. Consequently, that will help identification of mixed samples and greatly increase cost-effectiveness and efficiency of many legal cases [3].

Despite standard STR typing gives enough discrimination power for most applications, many improvements happened in forensic analyses due to use of large-scale sequencing [3]. For example, sequencing single nucleotide polymorphisms (SNPs) around and within STRs can maximize power in kinship analysis [5].

Single nucleotide polymorphisms

Single nucleotide polymorphisms are single base substitutions or insertion/deletions within the genome that responsible for most of the genetic variability in humans. Single nucleotide polymorphisms are four groups: identity-testing SNPs, Lineage-informative SNPs, ancestry-informative SNPs and phenotype-informative SNPs [6]. That makes it helpful for criminal investigations in identifying the assailant without the need for a reference [3]. Many traits, such as skin, eye and hair color, have 80–90% accuracy rate, while predicting body height has less accuracy rate [5]. Whole-genome sequencing in these cases based on NGS will help in obtaining more information and accuracy [3].

The replacement of STRs by SNPs could be highly beneficial, as many of the technical problems associated with STRs do not exist for SNPs. Very short polymerase chain reaction (PCR) amplicons enable successful SNP profiling from degraded DNA. Furthermore, stutter artifacts that complicate STR profile interpretations do not exist with SNP profiling, especially with samples of low

trudności, jakie wiążą się z STR, nie dotyczy SNP. Bardzo krótkie amplikony powstałe w wyniku reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) umożliwiają skuteczne profilowanie SNP w przypadku degradacji DNA. Ponadto w przypadku profilowania na podstawie SNP – szczególnie przy analizie próbek o niskiej zawartości DNA – brak jest artefaktów typu *stutter*, które utrudniają interpretację profilu uzyskanego badaniem markerów STR. Na koniec należy dodać, że SNP w związku z niższym współczynnikiem mutacji w porównaniu z STR wykazują wyższą stabilność, dzięki czemu mogą być wykorzystywane jako biomarkery pokrewieństwa lub historyczne. Lepiej sprawdzają się w badaniach pokrewieństwa i mogą stanowić skuteczną alternatywę dla markerów STR [2]. Główną trudnością związaną z zastępowaniem STR analizą SNP są istniejące już bazy danych kryminalistycznych zawierające profile STR, przy czym próbki kryminalistyczne mogą nie być przechowywane w celu ich ponownej analizy [5].

Autosomalne SNP mają pewne wady, np. wieloallelowe STR są bardziej polimorficzne niż dwuallelowe SNP [2]. SNP charakteryzują się przez to niższą mocą dyskryminacyjną i niską zdolnością wykrywania mieszanin po dekonwolucji w porównaniu z rutynowo wykorzystywanymi panelami STR. Efekt ten można jednak zniwelować, stosując większą liczbę SNP (20–50 autosomalnych SNP) w stosunku do STR (w analizie kryminalistycznej wykorzystuje się 10–15 STR) w połączeniu z technologiami genotypowania multipleksowego [2, 6].

Technologie głębokiego sekwencjonowania umożliwiają jednoczesną analizę SNP dostarczających informacji o fenotypie i tożsamości oraz markerów STR i DNA mitochondrialnego (mtDNA). Ostatnio pojawiła się możliwość analizy kompletnego genomu mitochondrialnego 25–50 osób na pojedynczym chipie Ion 316 (Ion Torrent), zapewniając tym samym zoptymalizowaną kosztowo analizę polimorfizmów SNP w regionach kontrolnych i kodujących [6].

Markery jednorodzicielskie (markery genetyczne pochodzenia)

Marker mitochondrialny

MtDNA jest istotnym markerem w kryminalistyce, gdy dostępna jest niewielka ilość DNA lub niezbędne jest oznaczenie relacji pokrewieństwa po stronie matki [3]. Siła dyskryminacyjna mtDNA jest stosunkowo ograniczona, gdyż sama analiza dotyczy

DNA amounts. Finally, SNPs, because of their lower mutation rate in comparison with STRs making them more stable when used as relationship or historical biomarkers, are better for kinship testing and may substitute STRs in such cases [2]. The major problem with such a substitution is already existing forensic databases that based on STR profiles, and forensic samples may not be stored for reanalysis [5].

The autosomal SNPs have disadvantages such as multi-allelic STRs being more polymorphic than bi-allelic SNPs [2]. Thus, SNPs have lower discrimination power and poor ability to detect deconvolute mixtures than routinely used STR panels. Although the using of a higher number of SNPs (20–50 autosomal SNPs) relative to STRs (10–15 forensically used STRs), added to multiplex genotyping technologies may compensate for this effect [2, 6].

Deep sequencing technologies could simultaneously analyze both phenotypic and identity SNPs with STRs and mitochondrial DNA (mtDNA). Recently, whole mitochondrial genome of 25 to 50 persons could be analyzed on a single Ion 316 chip (Ion Torrent) that leading to cost-effective analysis of SNP polymorphisms in both control and coding regions [6].

Uniparental markers (lineage-based genetic markers)

Mitochondrial marker

MtDNA is an important forensic marker in low DNA amounts or when the maternal relationship needs to be investigated [3]. The discriminatory power of mtDNA is somewhat restricted, because analysis is restricted to the non-coding control region [7]. While recent progress in whole mtDNA sequencing (based on NGS technology) has provided more mtDNA phylogeny understanding and revealed many mtDNA haplogroups. Many mtDNA haplogroups revealed certain continental distributions [2]. That increase the mtDNA power as being valuable sources of geographic information (maternal biogeographic ancestry) [8].

Interpreting mtDNA mixtures is one of the main problems in forensics. Mixture samples defined as DNA coming from more than one person

tylko niekodującego regionu kontrolnego [7]. Najnowsze dokonania w dziedzinie sekwencjonowania całego mtDNA (na bazie technologii NGS) umożliwiły dokładniejsze poznanie filogenii mtDNA i ujawniły liczne haplogrupy mtDNA. Wiele spośród haplogrup mtDNA wykazało określony rozkład kontynentalny [2]. Przekłada się to na wzrost znaczenia mtDNA jako cennego źródła danych geograficznych (o przodkach ze strony matki w ujęciu biogeograficznym) [8].

Jednym z podstawowych problemów kryminalistyki jest interpretacja wyników uzyskanych dla mieszanin mtDNA. Próbkę mieszaną zawierają DNA pochodzące od więcej niż jednej osoby [8]. Mieszaniny DNA mogą być skutkiem zanieczyszczenia próbki. Z mieszaniną mamy również do czynienia w przypadku próbek intymnego materiału biologicznego lub heteroplazmii [6]. Heteroplazmia odnosi się do mieszaniny sekwencji mtDNA w obrębie lub między komórkami pochodzącymi z różnych narządów należących do tej samej osoby. Ponieważ heteroplazmia ma wpływ na interpretację analizy mtDNA, należyte zrozumienie podstawy biologicznej heteroplazmii i zasad interpretacji wyników ma ogromne znaczenie [8]. Głównie ze względu na brak możliwości precyzyjnej dekonwolucji wariantów heteroplazmatycznych (metodą Sangera) badania tego typu nie są zazwyczaj uwzględniane w ekspertyzach kryminalistycznych. W ostatnich badaniach wykazano czułość NGS w wykrywaniu i oznaczaniu ilościowym wariantów heteroplazmatycznych i składników mieszanin nawet w bardzo małym stężeniu (1 : 250), co może sprzyjać dekonwolucji mieszanin [9].

W większości genomów eukariotycznych występują tzw. sekwencje NUMT – „jądrowe DNA pochodzenia mitochondrialnego” – potencjalnie na skutek integracji następującej w procesie naprawy podwójnej nici [10]. Obecność NUMT należy uwzględniać w ekspertyzach kryminalistycznych, które opierają się na analizie mtDNA, ponieważ amplifikacja niewielkiej liczby NUMT może dawać zafałszowany wynik heteroplazmii i wpływać na potencjał dyskryminacyjny [8].

Markery chromosomu Y

Możliwość identyfikacji mężczyzn w przypadkach napaści na tle seksualnym jest niezwykle przydatna. Dzięki szybko mutującemu Y-STR uzyskano możliwość rozróżniania blisko spokrewnionych mężczyzn w przypadkach napaści seksualnych z udziałem kilku spokrewnionych ze sobą sprawców. Niezależnie od po-

[8]. Possible explanations for a DNA mixture results are due to sample contamination, or due to an actual mixture such as an intimate sample or heteroplasmia [6]. Heteroplasmia is a mixture of mtDNA genome sequences within or between cells from different organs that belong to the same person. Since heteroplasmia has an impact during the mtDNA interpretation, the understanding of the biological basis of heteroplasmia and how to interpret the results are of great importance [8]. The inability to clearly deconvolute heteroplasmic variants (based on Sanger method) was the primary reason for not reporting it routinely in forensic cases. Recent studies have elucidated the sensitivity of NGS in detection and quantification of heteroplasmic variants and mixture components even at very low level (1 : 250) that may allow for the deconvolution of mixtures [9].

In most eukaryotic genomes, “Nuclear DNA of Mitochondrial origin” NUMTs are present and it may be happened due to integration during the process of double strand repair [10]. The presence of NUMTs should be considered in forensic cases that rely on mtDNA genome analysis as few NUMTs amplification can cause false representations of heteroplasmia and change discrimination potential [8].

Y chromosome markers

The capability to identify male in cases of sexual assault is extremely important. With the rapidly mutating (RM) Y-STRs, it became possible to differentiate closely related men in sexual assault cases with multiple related male perpetrators. However, Y-STRs with lower mutation rates is still be preferred in certain cases such as kinship testing or disaster victim identification (DVI) cases [3]. In addition, Y-SNPs from different geographical regions are identified [11]. Recent NGS study demonstrated that Y chromosome sequencing could distinguish between mixed samples of multiple males belong to the same parent [3].

Epigenetic markers

The analysis of tissue-specific DNA methylation is a promising method in forensics [12]. Recently, epigenetic markers can distinguish the small dif-

wyższego Y-STR o niższych współczynnikach mutacji są nadal preferowaną opcją w niektórych przypadkach badania pokrewieństwa albo identyfikacji ofiar katastrof [3]. Identyfikowane są także Y-SNP z różnych regionów geograficznych [11]. W niedawnym badaniu NGS wykazano, że sekwencjonowanie chromosomu Y pozwala na rozróżnienie próbek mieszanych zawierających materiał kilku mężczyzn mających tego samego rodzica [3].

Markery epigenetyczne

Obiecującą metodą kryminalistyczną jest także analiza metylacji DNA swoistego dla tkanek [12]. Aktualnie dzięki markerom epigenetycznym na bazie technologii NGS możliwe jest wykrywanie niewielkich różnic w sygnałach epigenetycznych pochodzących od 5000 par bliźniąt monozygotycznych [13, 14]. Dostępność technologii NGS umożliwia naukowcom badanie zmienności epigenetycznej z wysoką rozdzielczością. Niedawne badania epigenetyczne całego genomu pokazały skuteczność tej metody przy identyfikacji zmian o złożonych cechach u bliźniąt monozygotycznych [3]. Markery epigenetyczne pozwalają także na identyfikację płynów i tkanek ustrojowych, dokładne określanie wieku oraz wykrywanie sfałszowanych dowodów DNA [12, 15–17].

Mimo doniesień, że obecnie stosowane metody epigenetyczne bazujące na technologii NGS wymagają dużych ilości DNA, to dzięki pirosekwencjonowaniu udało się skutecznie zanalizować niezwykle małe ilości matrycowego DNA [3].

MikroRNA i niekodujące małe RNA

MikroRNA (miRNA) to niekodujące, małe cząsteczki RNA (ncRNA), które odgrywają kluczową rolę w regulacji wielu procesów życiowych. Dojrzałe miRNA charakteryzują się większą stabilnością niż mRNA, co ma istotne znaczenie dla badań kryminalistycznych. Umożliwia to odzysk miRNA ze skrawków tkanek utrwalonych w bloczkach parafinowych (FFPE) i jest skuteczniejsze od profilowania ekspresji mRNA z wykorzystaniem tkanek FFPE [18].

Ponadto ekspresja miRNA następuje w sposób tkankowo swoisty, dlatego też jest to idealny biomarker umożliwiający identyfikację płynów ustrojowych [19]. W ostatnim czasie przeprowadzono badanie, które wykazało, że NGS charakteryzuje się wyższą swoistością, dokładnością i odpornością w profilowaniu

ferences in epigenetic signals from 5000 pairs of monozygotycznych bliźniąt oparte na technologii NGS [13, 14]. Dostępność technologii NGS umożliwia naukowcom badanie zmienności epigenetycznej z wysoką rozdzielczością. Niedawne badania epigenetyczne całego genomu pokazały skuteczność tej metody przy identyfikacji zmian o złożonych cechach u bliźniąt monozygotycznych [3]. Markery epigenetyczne pozwalają także na identyfikację płynów i tkanek ustrojowych, dokładne określanie wieku oraz wykrywanie sfałszowanych dowodów DNA [12, 15–17].

Although it has been claimed that the current epigenetic approaches based on NGS technology require large amounts of DNA. Interestingly, extremely low amounts of starting DNA were successfully analyzed by using pyrosequencing [3].

MicroRNA and small non-coding RNAs

Micro-RNAs (miRNAs) are small non-coding RNA (ncRNA) molecules which has an essential regulative role in many cellular processes. Mature miRNAs are more stable than mRNAs which is important in forensic investigations. Thus, the miRNA recovery from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues is possible and it is better than FFPE tissue mRNA expression profiling [18].

Moreover, miRNA is expressed in tissue-specific manner so it is an ideal biomarker for body fluid identification [19]. Recent study showed that NGS is with higher sensitivity, accuracy and robustness in miRNAs profiling in both frozen and FFPE tissues [20]. Furthermore, newly discovered small ncRNAs have not yet been thoroughly studied. The profiling of ncRNA is a promising tool in forensic analysis [21, 22].

Markers of non-human origin

Species identification is of great value in forensic practice in case of trading and poaching of endangered species, archeology and food industry [3].

Forensic entomology includes using of insects and arthropods to help medico-legal investigations such as identifying cases of abuse, corpse movements, and postmortem (PM) interval estimates. Molecular tools are very important in species identification; however, NGS technologies have the potential to widen molecular applica-

miRNA zarówno w przypadku tkanek zamrożonych, jak i FFPE [20]. Niedawno odkryte niekodujące małe RNA (ncRNA) nie zostało jeszcze dokładnie zbadane. Profilowanie ncRNA jest jednak obiecującym narzędziem służącym do analizy kryminalistycznej [21, 22].

Markery pochodzenia innego niż ludzkie

Identyfikacja gatunkowa jest niezwykle przydatna w praktyce kryminalistycznej, np. w przypadkach kłusownictwa i handlu zagrożonymi gatunkami, a także w archeologii i branży spożywczej [3].

Entomologia sądowa jest dziedziną, w ramach której prowadzone są badania owadów i innych stawonogów do celów lekarsko-sądowych, przy identyfikacji zgonów na skutek przemocy, podejrzenia przeniesienia zwłok czy szacowaniu czasu zgonu. Metody molekularne odgrywają dużą rolę w identyfikacji gatunkowej, natomiast technologie NGS pozwalają na poszerzenie zakresu zastosowań molekularnych w entomologii sądowej o identyfikację i przynależność do danej populacji [23]. W ostatnich badaniach udało się pomyślnie zastosować NGS przy identyfikacji części i całości genomów mtDNA należących do różnych gatunków Diptera analizowanych do celów kryminalistycznych. Porównanie całych genomów mtDNA różnych gatunków pozwala na wykrywanie zmienności genetycznej na różnych poziomach taksonomicznych, przy wykorzystaniu bardziej informatywnych markerów [24].

Mikrobiologia sądowa specjalizuje się w wykorzystywaniu mikroorganizmów w dochodzeniu bioprzestępstw czy ataków bioterrorystycznych. Umożliwia opracowywanie charakterystyki próbek na wysokim poziomie swoistości, z uwzględnieniem identyfikacji danego mikroorganizmu na różnych poziomach – gatunku, szczepu, izolatu, a nawet naczynia hodowlanego, z którego pochodzi próbka. Mikroorganizmy odgrywają także istotną rolę w procesach rozkładu [25]. Pechal i wsp. (2013) wykazali, że bakterie bytujące na skórze i w środowisku jamy ustnej przechodzą stałe zmiany w procesie rozkładu [26]. Dzięki dalszemu rozwojowi sekwencjonowania możliwa jest szczegółowa analiza mikroorganizmów w procesie rozkładu zwłok. Przyczyni się to do szczegółowego poznania ekologii mikrobiologicznej procesu rozkładu zwłok oraz rozwoju zastosowań mikroorganizmów w charakterze materiału dowodowego umożliwiającego prawidłowe ustalenie czasu zgonu [27].

tions in forensic entomology to involve identifications and population assignments [23]. Recent studies recorded the success of NGS in identifying partial and whole mt genomes belong to different Diptera of forensic interest. The comparison of whole mt genomes among many species allows the identification of genetic variability at different taxonomic levels, and that explore more informative markers [24].

Microbial forensics includes analysis of microbe to solve biocrimes and bioterrorist events. Attribution is a sample characterization with high specificity, including identification of a microorganism at different levels such as species, strain, isolate or even the culture vessel from which the sample originated. Moreover, microbes play an important role in decomposition [25]. Pechal *et al.* (2013) elucidated that bacterial communities in skin and mouth followed a consistent change during decomposition [26]. Consequently, the microbiology of corpse decomposition can be examined in detail depending on sequencing advances. This will help in understanding the microbial ecology of corpse decomposition and using microbes as evidence with correct estimate of PM interval [27].

As high-throughput sequencing (HTS) technologies continue in introducing powerful tools in microbial forensics [25]. Recent studies elucidated that different systems of NGS technology has the abilities for identification of biological traces and suspect [3]. Furthermore, it able to detect microorganisms in low abundance and differentiate them from others by genomic signatures [25]. It is also highly sensitive in tracing genomic differences among isolates so it is a better biomarker than PCR probes, which target limited information [28, 29].

Soil analysis includes identification of soil source are commonly used in forensic investigations to link a suspect to certain location such as crime scene. DNA analysis can also be applied to characterize the soil organisms [30, 31]. DNA metabarcoding and HTS improve discrimination between forensic soil samples by using multiple DNA markers targeting different taxa (bacterial, eukaryotic, plant and fungi) for forensic soil analysis [30, 32].

Rozwojowi mikrobiologii sądowej sprzyjają także technologie sekwencjonowania wysokiej przepustowości (HTS), dostarczając tej dziedzinie skutecznych narzędzi [25]. Ostatnie badania wyjaśniono, że różne systemy bazujące na technologii NGS umożliwiają identyfikację śladów biologicznych oraz podejrzanych [3]. Dzięki metodzie można też wykrywać mikroorganizmy występujące w niewielkich ilościach oraz wyodrębnić je spośród innych przy wykorzystaniu podpisów genomowych [25]. Metoda odznacza się również wysokim poziomem czułości przy śledzeniu różnic genomowych w poszczególnych izolatach, co czyni ją lepszym markerem niż sondy PCR, które są mniej informatywne [28, 29].

Analiza glebowa umożliwiająca identyfikację źródła pochodzenia gleby jest metodą powszechnie stosowaną w badaniach kryminalistycznych. Pozwala ona na powiązanie podejrzanego z określonymi lokalizacjami (np. miejscem popełnienia przestępstwa). Możliwe jest również wykorzystywanie analizy DNA przy opisywaniu organizmów bytujących w glebie [30, 31]. Przy analizie próbek gleby do celów kryminalistycznych możliwość ich rozróżnienia uzyskuje się dzięki technikom metabarcodingu DNA i HTS poprzez wykorzystanie licznych markerów DNA ukierunkowanych na różne taksony (bakteryjne, eukariotyczne, roślinne i grzybowe) [30, 32].

Markery molekularne w ustalaniu przyczyny śmierci

Sekcja zwłok z wynikiem negatywnym oznacza sytuację, w której tradycyjne badanie autopsyjne nie pozwala na określenie przyczyny i/lub rodzaju zgonu [33]. Podejmowane są badania, których celem jest analiza i walidacja autopsji molekularnej jako narzędzia przy ustalaniu przyczyny śmierci. Autopsja molekularna opiera się na nowoczesnej technologii, a wysoki koszt aktualnie dostępnych metod jest przeszkodą w ich rozpowszechnieniu. Wśród badań molekularnych potencjalnie usprawniających pracę patologów sądowych należy wymienić badania w kierunku zespołu nagłej nieoczekiwanej śmierci (SUD), nagłej śmierci sercowej (SCD), zespołu nagłej śmierci łóżeczkowej (SIDS) lub nietypowych zgonów związanych ze stosowaniem narkotyków. Istotne informacje uzyskiwane dzięki badaniom molekularnym tego rodzaju mogłyby być przydatne dla celów medycyny sądowych [33, 34].

Cause of death molecular markers

Negative autopsy is the situation where traditional autopsy cannot determine the cause of death and/or mode of death [33]. Many efforts as a trial to carry out and validate molecular autopsy tool in investigations of the cause of death. Because the molecular autopsy is technology-dependent, the costs of current techniques are major obstacles for widespread use. Molecular studies that could help the autopsy pathologist include analysis for sudden unexplained deaths (SUDs) such as sudden cardiac death (SCD), sudden infant death syndrome (SIDS), or untypical drug-related deaths. The valuable information obtained from these molecular tests may have medico-legal importances [33, 34].

Sudden unexplained deaths are the cases which remain unexplained after routine autopsy and investigations. Sudden cardiac death in young is often caused by cardiomyopathies and channelopathies [35]. Despite the progress in knowledge of SCD, it is a public-health problem [36]. One of the difficulties is to identify the person at risk where the sudden death is most of the times the first manifestation. Identifying pre-symptomatic persons carrying genetic variant that predisposes them to SCD by genetic tests are very important [37]. They could also display a potential cardiac mechanism and declare the cause of death and mode of death [38].

Next generation sequencing allowed the scientists to accurately detect mutations in a fast and cost-efficient way [39]. Cardiac evaluation for living relatives and molecular autopsy of SUD victims should theoretically declare causes of SUD. The benefits of that approach are to find the cause of death and to identify other family member at-risk [40].

The sudden infant death syndrome is the sudden unexpected death of an infant less than 1 year of age with onset of the fatal attack during sleep that appears unexplained after a thorough investigation including complete autopsy, the death circumstances and clinical history. Limitation of current approach in SIDS is inability to find new genes in novel pathways that responsible for that disease. Novel technology will develop genomic profile of the vulnerable infant mainly by conducting comparison between SIDS cases and controls [41].

Nagła nieoczekiwana śmierć dotyczy sytuacji, w której zgon pozostaje niewyjaśniony po przeprowadzeniu rutynowej autopsji i innych badań. Nagła śmierć sercowa u młodych osób jest często skutkiem kardiomiopatii i kanałopatii [35]. Niezależnie od rozwoju wiedzy na temat SCD, zjawisko nadal stanowi istotny problem dla zdrowia publicznego [36]. Jedną z trudności jest identyfikacja osoby narażonej na ryzyko, ponieważ nagły zgon jest zazwyczaj pierwszym objawem choroby. W tym kontekście istotnego znaczenia nabiera wykrywanie za pomocą testów genetycznych – jeszcze przed wystąpieniem objawów – osób będących nosicielami wariantu genetycznego predysponującego do wystąpienia SCD [37]. Testy tego typu mogłyby też identyfikować potencjalny mechanizm sercowy oraz ustalać przyczynę i rodzaj zgonu [38].

Sekwencjonowanie nowej generacji umożliwiło naukowcom dokładne, a przy tym szybkie i niedrogie wykrywanie mutacji [39]. Badanie serca u żyjących krewnych w połączeniu z autopsją molekularną u osób zmarłych z powodu SUD powinny teoretycznie dawać możliwość określenia przyczyny SUD. Korzyści z takiego podejścia obejmują ustalenie przyczyny zgonu, a także określenie, czy inni członkowie rodziny są narażeni na analogiczne ryzyko [40].

Pod pojęciem zespołu nagłego zgonu niemowląt rozumie się nagłą i niespodziewaną śmierć dziecka poniżej 1. roku życia następującą w czasie snu, której przyczyna pozostaje nieustalona niezależnie od dokładnych badań, m.in. pełnego badania pośmiertnego, analizy okoliczności śmierci oraz wywiadu klinicznego dziecka. Ograniczeniem aktualnego podejścia stosowanego w przypadku SIDS jest brak możliwości wykrycia nowych genów działających w obrębie nowych szlaków, które są odpowiedzialne za wystąpienie tego zjawiska. Innowacyjna technologia w tej dziedzinie pozwoli na opracowanie profilu genomowego niemowlęcia podanego na SIDS – głównie na drodze porównań między przypadkami SIDS oraz przypadkami kontrolnymi [41]. Tym samym przydatne może być uwzględnienie autopsji molekularnej w aktualnej praktyce medyczno-sądowej po przeprowadzeniu sekcji zwłok z wynikiem negatywnym [42].

Farmakogenomika (PGx) i farmakogenetyka (PGt) są dziedzinami, które zajmują się zależnościami między dziedziczonymi przez poszczególne osoby czynnikami a zapisywanymi lekami. Zasadniczym celem PGx i PGt jest zapewnienie skutecznego i bezpiecznego leczenia dostosowanego do danego pacjen-

Therefore, molecular autopsy is helpful if included in current practice after negative autopsy [42].

Pharmacogenomics (PGx) and pharmacogenetics (PGt) deal with relationship between inheritable factors in each individual and prescribed drugs. The main goal of PGx/PGt is to achieve effective and safe drug treatment; without adverse drug reaction tailored for each person [43]. The emerging toxicogenomics field (the use of gene-expression profiling in toxicology) represent an interesting approach to predict toxicity and to understand the mechanism of action of the compounds under study [44]. These are rapidly evolving fields due to the rapid advances in genotyping and NGS technologies could scan the genome at high levels of resolution [45]. The PM significance of data from PGT/PGx is to determine cause of death and mode of death [33, 43]. Personalized justice referred to the use of PM PGT/PGx in medico-legal cause of death investigation as an analog to personalized medicine.

Conclusions

Advancement of science will continue as long as the development in the investigative tools. New technologies such as NGS offer many advantages that outperform the conventional method. That encouraged the researchers to assess these technologies in different fields of forensic sciences. Consequently, that opened the way to new applications which will help legal and forensic sciences. Requirement of valid and robust processes is mandatory before using any new procedure in forensic laboratories. Furthermore, accuracy and cost are important criteria that stand behind the wise choice of optimal sequencing platform. Till that time, research will go ahead to advance.

The authors declare no conflict of interest.

ta przy wyeliminowaniu działań niepożądanych leków [43]. Toksykogenomika jest rozwijającą się dziedziną nauki, zajmującą się wykorzystywaniem profilowania ekspresji genów w toksykologii. Stanowi ciekawe podejście do prognozowania toksyczności i zrozumienia mechanizmu działania badanych związków [44]. Są to dynamicznie rozwijające się dyscypliny w związku z szybkim postępem w genotypowaniu i technologii NGS. Umożliwiają skanowanie genomu z zachowaniem wysokiego poziomu rozdzielczości [45]. Znaczenie danych dostarczanych przez PGt i PGx w kontekście badań pośmiertnych polega na ustaleniu przyczyny i rodzaju zgonu [33, 43]. Przez analogię do medycyny personalizowanej prognozuje się również personalizację w wymiarze sprawiedliwości – dzięki wykorzystaniu pośmiertnych badań PGt i PGx w medyczno-sądowym ustalaniu przyczyny zgonu.

Wnioski

Wraz z rozwojem narzędzi badawczych należy spodziewać się stałego postępu w dziedzinie nauki. Nowe technologie, np. NGS, przyniosły wiele wymiernych korzyści, dzięki którym są skuteczniejsze od metod konwencjonalnych. Skłoniło to badaczy do weryfikacji nowych technologii w różnych gałęziach nauk kryminalistycznych. W ten sposób utworowano drogę do nowych zastosowań, które będą przydatne w dziedzinie kryminalistyki. Przed zastosowaniem nowych procedur w laboratoriach kryminalistycznych niezbędne jest jednak potwierdzenie ich wiarygodności i przydatności w procesie badawczym. Istotnymi kryteriami są również dokładność i koszty analizy, co ma wpływ na racjonalny wybór optymalnej platformy sekwencjonowania. Badania mają istotne znaczenie także w tym aspekcie.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

References

1. Mostafa EM, Sabri DM, Aly SM. Overviews of “next-generation sequencing”. Res Rep Forensic Med Sci 2015; 1-5.
2. Kayser M, de Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. Nat Rev Genet 2011; 12: 179-192.
3. Yang Y, Xie B, Yan J. Application of next-generation sequencing technology in forensic science. Genomics Proteomics Bioinformatics 2014; 12: 190-197.
4. Hu N, Cong B, Li S, Ma C, Fu L, Zhang X. Current developments in forensic interpretation of mixed DNA samples (Review). Biomed Rep 2014; 2: 309-316.
5. Berglund EC, Kiiäläinen A, Syvänen AC. Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics. Investig Genet 2011; 2: 23.



6. Jaiprakash GS, Ray HL (eds.). *Forensic DNA Analysis: Current Practices and Emerging technologies*: CRC Press 2013.
7. Parson W, Strobl C, Huber G, Zimmermann B, Gomes SM, Souto L, Fendt L, Delpont R, Langit R, Wootton S, Lagacé R, Irwin J. Evaluation of next generation mtGenome sequencing using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM). *Forensic Sci Int Genet* 2013; 7: 543-549.
8. Melton T, Holland C, Holland M. Forensic mitochondrial DNA analysis: current practice and future potential. *Forensic Sci Rev* 2012; 24: 101-122.
9. Holland MM, McQuillan MR, O'Hanlon KA. Second generation sequencing allows for mtDNA mixture deconvolution and high resolution detection of heteroplasmy. *Croat Med J* 2011; 52: 299-313.
10. Lenglez S, Hermand D, Decottignies A. Genome-wide mapping of nuclear mitochondrial DNA sequences links DNA replication origins to chromosomal double-strand break formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Res* 2010; 20: 1250-1261.
11. Van Geystelen A, Decorte R, Larmuseau MH (2013) AMY-tree: an algorithm to use whole genome SNP calling for Y chromosomal phylogenetic applications. *BMC Genomics* 14: 101.
12. Lee HY, Park MJ, Choi A, An JH, Yang WI, Shin KJ. Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification. *Int J Legal Med* 2012; 126: 55-62.
13. Bell JT, Spector TD. A twin approach to unraveling epigenetics. *Trends Genet* 2011; 27: 116-125.
14. Li C, Zhao S, Zhang N, Zhang S, Hou Y. Differences of DNA methylation profiles between monozygotic twins' blood samples. *Mol Biol Rep* 2013; 40: 5275-5280.
15. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, Vilain E. Epigenetic predictor of age. *PLoS One* 2011; 6: e14821.
16. Frumkin D, Wasserstrom A, Budowle B, Davidson A. DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Sci Int Genet* 2011; 5: 517-524.
17. Frumkin D, Wasserstrom A, Davidson A, Graft A. Authentication of forensic DNA samples. *Forensic Sci Int Genet* 2010; 4: 95-103.
18. Courts C, Madea B. Specific micro-RNA signatures for the detection of saliva and blood in forensic body-fluid identification. *J Forensic Sci* 2011; 56: 1464-1470.
19. Wang Z, Luo H, Pan X, Liao M, Hou Y. A model for data analysis of microRNA expression in forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet* 2012; 6: 419-423.
20. Tam S, de Borja R, Tsao MS, McPherson JD. Robust global microRNA expression profiling using next-generation sequencing technologies. *Lab Invest* 2014; 94: 350-358.
21. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 94-108.
22. Courts C, Madea B. Micro-RNA – a potential for forensic science? *Forensic Sci Int* 2010; 203: 106-111.
23. Farncombe KM, Beresford D, Kyle CJ. Characterization of microsatellite loci in *Phormia regina* towards expanding molecular applications in forensic entomology. *Forensic Sci Int* 2014; 240: 122-125.
24. Nelson LA, Lambkin CL, Batterham P, Wallman JF, Dowton M, Whiting MF, Yeates DK, Cameron SL. Beyond barcoding: a mitochondrial genomics approach to molecular phylogenetics and diagnostics of blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Gene* 2012; 511: 131-142.
25. Budowle B, Connell ND, Bielecka-Oder A, Colwell RR, Corbett CR, Fletcher J, Forsman M, Kadavy DR, Markotic A, Morse SA, Murch RS, Sajantila A, Schmedes SE, Ternus KL, Turner SD, Minot S. Validation of high throughput sequencing and microbial forensics applications. *Investig Genet* 2014; 5: 9.
26. Pechal JL, Crippen TL, Tarone AM, Lewis AJ, Tomberlin JK, Benbow ME. Microbial community functional change during vertebrate carrion decomposition. *PLoS One* 2013; 8: e79035.
27. Metcalf JL, Wegener Parfrey L, Gonzalez A, Lauber CL, Knights D, Ackermann G, Humphrey GC, Gebert MJ, Van Treuren W, Berg-Lyons D, Keepers K, Guo Y, Bullard J, Fierer N, Carter DO, Knight R. A microbial clock provides an accurate estimate of the postmortem interval in a mouse model system. *Elife* 2013; 2: e01104.
28. Jakupciak JP, Wells JM, Karalus RJ, Pawlowski DR, Lin JS, Feldman AB. Population-sequencing as a Biomarker of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* evolution through microbial forensic analysis. *J Nucleic Acids* 2013; 2013: 801505.
29. Sjodin A, Broman T, Melefors O, Andersson G, Rasmuson B, Knutsson R, Forsman M. The need for high-quality whole-genome sequence databases in microbial forensics. *Biosecure Bioterror* 2013; 11 Suppl 1: S78-86.
30. Giampaoli S, Berti A, Di Maggio RM, Pilli E, Valentini A, Valeriani F, Gianfranceschi G, Barni F, Ripani L, Romano Spica V. The environmental biological signature: NGS profiling for forensic comparison of soils. *Forensic Sci Int* 2014; 240: 41-47.
31. Meyers MS, Foran DR. Spatial and temporal influences on bacterial profiling of forensic soil samples. *J Forensic Sci* 2008; 53: 652-660.
32. Young JM, Weyrich LS, Cooper A. Forensic soil DNA analysis using high-throughput sequencing: a comparison of four molecular markers. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 13: 176-184.
33. Axler-DiPerte G BF, Budmlija ZM, Sajantila A, Siegel D, Tang Y. Molecular autopsy. In: Primorac D SM, editor. *Forensic DNA applications: An interdisciplinary perspective*. Taylor Francis Group 2014; 453-483.
34. Ubelaker D (ed.). *Forensic science: Current issues, future directions*. Wiley-Blackwell, Philadelphia 2012.



35. Hertz CL, Christiansen SL, Ferrero-Miliani L, Fordyce SL, Dahl M, Holst AG, Ottesen GL, Frank-Hansen R, Bundgaard H, Morling N. Next-generation sequencing of 34 genes in sudden unexplained death victims in forensics and in patients with channelopathic cardiac diseases. *Int J Legal Med* 2015; 129: 793-800.
36. Arking DE, Sotoodehnia N. The genetics of sudden cardiac death. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2012; 13: 223-239.
37. Morini E, Sangiuolo F, Caporossi D, Novelli G, Amati F. Application of Next Generation Sequencing for personalized medicine for sudden cardiac death. *Front Genet* 2015; 6: 55.
38. Loporcaro CG, Tester DJ, Maleszewski JJ, Kruisselbrink T, Ackerman MJ. Confirmation of cause and manner of death via a comprehensive cardiac autopsy including whole exome next-generation sequencing. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138: 1083-1089.
39. Brion M, Blanco-Verea A, Sobrino B, Santori M, Gil R, Ramos-Luis E, Martinez M, Amigo J, Carracedo A. Next generation sequencing challenges in the analysis of cardiac sudden death due to arrhythmogenic disorders. *Electrophoresis* 2014; 35: 3111-3116.
40. Semsarian C, Ingles J, Wilde AA. Sudden cardiac death in the young: the molecular autopsy and a practical approach to surviving relatives. *Eur Heart J* 2015; 36: 1290-1296.
41. Van Norstrand DW, Ackerman MJ. Genomic risk factors in sudden infant death syndrome. *Genome Med* 2010; 2: 86.
42. Campuzano O, Allegue C, Sarquella-Brugada G, Coll M, Mates J, Alcalde M, Ferrer-Costa C, Iglesias A, Brugada J, Brugada R. The role of clinical, genetic and segregation evaluation in sudden infant death. *Forensic Sci Int* 2014; 242: 9-15.
43. Rutty GN (ed.). *Essentials of autopsy practice: Advances, updates and emerging technologies*. Springer 2013.
44. Kleinjans J (ed.). *Toxicogenomics-based cellular models: alternatives to alternatives to animal testing for safety assessment*. Academic Press 2014.
45. Abu-Elmagd M, Assidi M, Schulten HJ, Dallol A, Pushparaj P, Ahmed F, Scherer SW, Al-Qahtani M. Individualized medicine enabled by genomics in Saudi Arabia. *BMC Med Genomics* 2015; 8 Suppl 1: S3.

Adres do korespondencji

Sanaa M. Aly
 Forensic Medicine and Clinical Toxicology Department
 Faculty of Medicine
 Suez Canal University
 41522 Ismailia, Egypt
 e-mail: sasydayem@hotmail.com

Address for correspondence

Sanaa M. Aly
 Forensic Medicine and Clinical Toxicology Department
 Faculty of Medicine
 Suez Canal University
 41522 Ismailia, Egypt
 e-mail: sasydayem@hotmail.com