



DEPARTMENT OF DEFENSE
ARMED FORCES INSTITUTE OF PATHOLOGY
WASHINGTON DC 20306-6000



Office of the Armed Forces Medical Examiner
Armed Forces DNA Identification Laboratory
AFIP-CME-DNA (40-31a)

26 February 2009

AFDIL Case No. 2008C-0372 **(Final Report)**

Investigation Committee
Prosecutor Office of Russian Federation
Tekhnicheskij per. 2
Moscow 105005, Russia

Vladimir N. Solovyev
Senior Investigator of the Most Important Cases
General Investigator Department Investigator Committee
Prosecutor's Office of Russian Federation
Senior Advisor of Justice

SUBJECT: DNA Identification of Romanov Children Remains

Обстоятельства дела

1 октября 2007 года в лабораторию ДНК армии (AFDIL) обратился старший следователь Владимир Соловьёв с просьбой о проведении судебно-медицинского исследования ДНК нескольких скелетированных останков, обнаруженных вблизи Старой Коптяковской дороги в окрестностях Екатеринбурга, Россия. Эти образцы были изъяты из «второго захоронения», найденного очень близко от скелетированных останков, исследованных ранее Гиллом и др. (1) и идентифицированных как семья Российского императора (включая четырёх слуг).

12 ноября 2007 года д-р Майкл Коббл, руководитель исследовательской секции, AFDIL, прибыл в Екатеринбург для осмотра и отбора нескольких образцов для ДНК исследования. В марте 2008 года два Российских учёных, Тамара Николаевна Цитович и Наталья Анатольевна Бандуренко, прибыли в AFDIL для

наблюдения за исследованием останков. По независимым от обеих сторон обстоятельствам Майкл Коббл в апреле 2008 года поехал в Екатеринбург для отбора и транспортировки в AFDIL десяти других образцов из второго захоронения. В мае 2008 года два Российских учёных Елена Трынова и Елена Вылегжанина прибыли в институт медицины (GMI, Innsbruck, Austria) для наблюдения за исследованием останков в этой лаборатории. Здесь мы представляем общий отчёт окончательных результатов обеих лабораторий - AFDIL и GMI.

Предыдущие ДНК исследования

ДНК- исследования останков, обнаруженных в 1991 году было проведено Питером Гиллом и др. в лаборатории Forensic Science Service (FSS) и д-ром Павлом Ивановым, Российским генетиком [1]. Исследование ядерной ДНК по пяти STR-маркерам и определение пола скелетов позволило установить кровнородственную связь останков, и возможную принадлежность их царю, царице и трём их дочерям, обнаруженным в захоронении. Предыдущие исследования митохондриальной ДНК (Figure 1) подтвердили кровнородственную связь по материнской линии HRH принца Филиппа, герцога Эдинбургского, царицы и трёх её дочерей. Исследование ДНК герцога Файфа и принцессы Ксении Шереметьевой- Сфири, кровных родственников Николая по материнской линии, было использовано для подтверждения принадлежности останков царю. Точковая гетероплазмия в позиции 16169 (С/Т = "У") наблюдалась в митохондриальной

последовательности царя, в то время как у его родственников по материнской линии было установлено 16169 Т. Для подтверждения гетероплазмии ДНК исследования, полученные в идентификационной лаборатории армии (AFDIL) сравнили с митохондриальным гаплотипом останков Великого князя Георгия Романова (ум. 1899), брата царя Николая II [2]. И царь Николай II, и Великий князь Георгий Романов имели гетероплазмию в позиции 16169 – но в разных соотношениях: у царя было С/т , тогда как у его брата было Т/с.

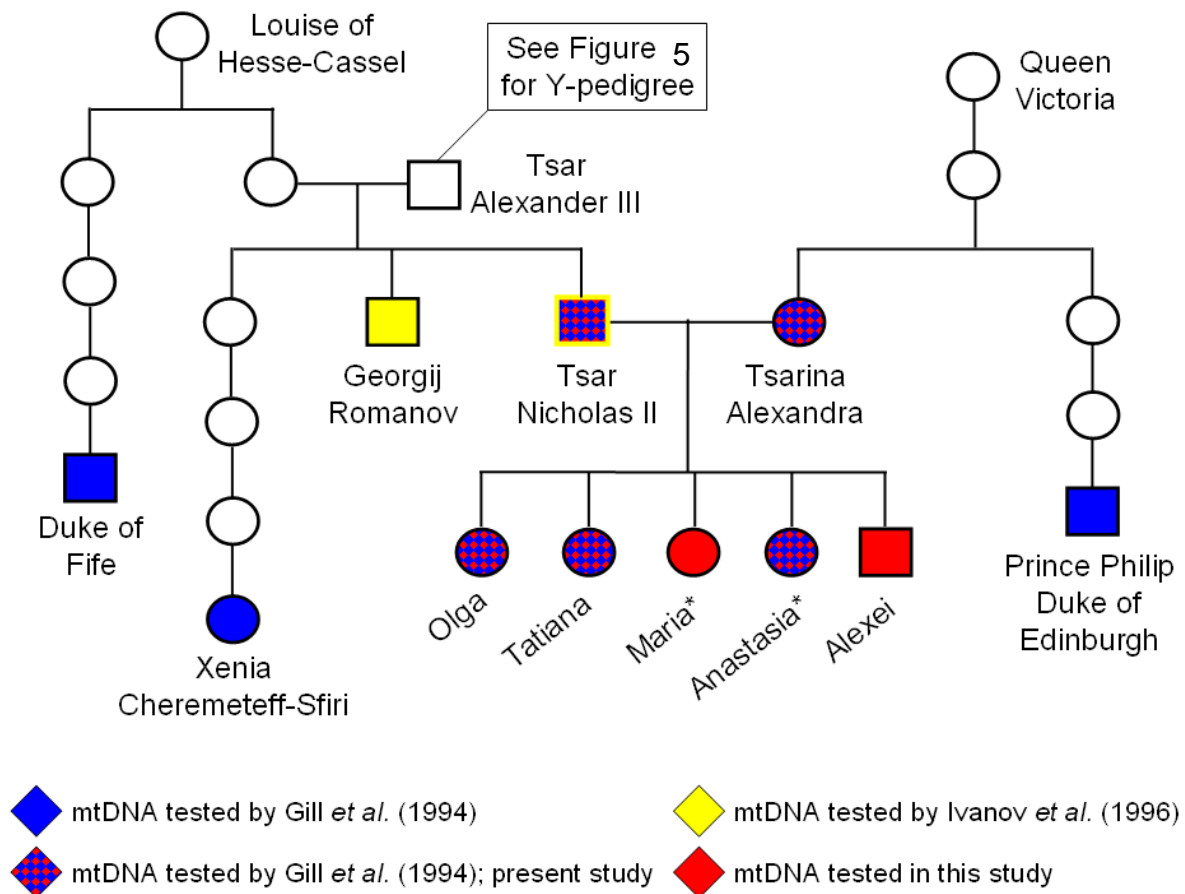


Figure 1. предыдущее и настоящее исследование мтДНК семьи Романовых.

Несмотря на убедительные свидетельства судебно-медицинских исследований, остались сомнения в принадлежности останков. [3]. Скептики увидели в том, что в массовом захоронении не найдены двое детей – Алексей и одна из его сестёр – доказательство того, что найденные в массовом захоронении тела не принадлежат царской семье. Идентификация найденной княжны вызвала большие разногласия между российскими и американскими судебно-медицинскими антропологами: русские считали найденной Марию, тогда как американские эксперты считали найденной Анастасию[4]. Вместо того, чтобы, наконец, приоткрыть почти семидесятилетнюю судьбу Романовых идентификация только пяти из семи членов семьи Романовых продолжала подогревать слухи и догадки о том, будто бы эти двое каким-то чудесным образом избежали пуль во время убийства и уехали из России. В последующие годы было предпринято несколько попыток найти «второе» захоронение, которое должно было быть неподалёку (Пётр Сарандинаки, фонд «Поиск», личное общение). Летом 2007 года группа археологов-любителей обнаружила несколько костных фрагментов приблизительно в 70 метрах от первого захоронения. В последствии официальная археологическая экспедиция под руководством д-ра Сергея Погорелова, исполняющего обязанности директора Свердловского областного археологического института, обнаружила в этом месте 44 костных фрагмента и зубы, которые очень осторожно изъяты из места захоронения.

После тщательного проведения исследований останков российские и американские антропологи пришли к следующим научным выводам:

- По анатомическим признакам парных анатомических образований таких как лопатки и седалищные кости можно было говорить о принадлежности их не менее (или минимум) двум людям
- Останки одного лица принадлежат женщине, что чётко видно по размеру седалищной вырезки, биологический возраст которой около 15-19
- пол другого лица возможно мужской, судя по начальной ширине седалищной вырезки биологический возраст лица в пределах 12-15
- При наличии ограниченного фрагментированного материала в сочетании с отсутствием явных диагностических анатомических признаков было невозможно установить прижизненный рост и расовую принадлежность останков
- Три серебряных пломбы, найденные в коронках двух моляров, обнаруженных в захоронении, указывают на то, что, по крайней мере у одного человека был аристократический статус
- Общий возраст захоронения скорее всего более 60 лет, если основываться на культурно-диагностических материалах, найденных среди останков

В конце 2007 году Российское правительство пригласило группу учёных провести независимые ДНК исследования останков из второго захоронения. Мы представляем результаты исследований митохондриальной ДНК, аутосомной и Y-STR этих останков в двух независимых лабораториях, специализирующихся на древней ДНК (aDNA): AFDIL и GMI. Мы представляем также результаты новых исследований останков из первого захоронения, принадлежащих царю Николаю II, его жене Александре, трём его дочерям Ольге, Татьяне и третьей дочери, которой могли быть либо Анастасия, либо Мария. ДНК анализ образцов из второго захоронения во всех трёх генетических системах подтвердил принадлежность их двум детям царя Николая II и царицы Александры – одного ребёнка женского пола, другого - мужского пола, что положило конец домыслам о ненайденных детях Романовых.

Объекты исследования

** Объекты из захоронения, обнаруженного в 2007 году*

Фрагменты десяти из 44 образцов были отобраны для ДНК анализа: девять костных фрагментов (череп, таз, лопатка, бедро) и половина коронки моляра. Предполагалось получить полный профиль ДНК из зуба, однако мы решили сохранить, а не разрушать материал в процессе исследования. Два из девяти образцов (146.1 и 147) были разделены и протестированы 3 независимыми группами: AFDIL (исследовательский отдел), AFDIL (отдел митохондриального исследования) и GMI лаборатория. Отдел митохондриального исследования также анализировал остальные семь образцов и сосредоточился только на исследовании мтДНК этих образцов следуя стандартным протоколам (Table 1).

Table 1. Sequences of the samples recovered from “Grave #2” in August 2007 and tested in this study.

Bone	Russian #	Region Sequenced	Sequence
Right humerus	141	16024-16391 and 35-369	16111T, 16357C, 263G, 315.1C
Occipital fragment	139	no results	--
Occipital fragment	144.1	16024-576	16111T, 16357C, 16519C, 263G, 315.1C, 524.1A; 524.2C
Right os coxae-♀	145	16024-16391 and 35-369	16111T, 16357C, 263G, 315.1C
Left femur	146.1*	16024-576	16111T, 16357C, 16519C, 263G, 315.1C, 524.1A; 524.2C
Right femur - ♀	147*	16024-576	16111T, 16357C, 16519C, 263G, 315.1C, 524.1A; 524.2C
Right scapula	140	16024-16391 and 35-369	16111T, 16357C, 263G, 315.1C
Cranial fragment	143	16024-16391 and 35-369	16111T, 16357C, 263G, 315.1C
Left ilium	142	no results	--

Образцы, обозначенные (*) были исследованы в AFDIL и GMI.

*Объекты, обнаруженные в захоронении 1991 года

Останки царя и его семьи были похоронены в Кафедральном Петро-Павловском Соборе, г. Санкт-Петербург, Россия, 2001 год. К счастью, в лаборатории Свердловского областного бюро судебно-медицинской экспертизы (Екатеринбург) предусмотрели возможность в будущем повторных ДНК исследований и сохранили ограниченное количество фрагментов от всех скелетов. По два-три образца от каждого индивидуума (кость и (или) зуб) были представлены в AFDIL и GMI лаборатории для ДНК анализов. Для удобства мы сохранили следующие обозначения скелетов царской семьи в соответствии с обозначениями, данными в России во время антропологических реконструктивных исследований в середине девяностых: скелет №3 = Ольга; скелет №4 = царь Николай II; скелет №5 = Татьяна; скелет №6 = Анастасия; and скелет №7 = царица Александра (таблица 2).

Table 2. Образцы из “захоронения №1”, исследованные ранее в 1990е годы и изученные в этом исследовании.

Skeleton	Attribution	Samples	Bone/Teeth
# 3	Olga	3.46*	Fragment of a left femur
		3.4	Partial tooth
#4	Nicholas	4.29	Fragment of a rib
		4.51*	Fragment of a calcaneus
		4a*	Partial tooth
		4.44	<i>Fragment of a pelvis</i>
#5	Tatiana	5.21*	Fragment of a left femur
		5.29	Fragment calcaneus
#6	Anastasia	6.14*	Fragment of the diaphyse of a left femur
		6.16*	Fragment of the diaphyse of a left tibia

#7	Alexandra	7.48	Fragment of a pelvis
		7.49*	Fragment of the diaphyse of a left tibia
		7a	Partial tooth
		7.40	<i>Fragment of the diaphyse of a left femur</i>

Образцы, обозначенные (*) были посланы в обе лаборатории: в AFDIL и GMI для изучения. Образцы, написанные курсивом были представлены только в GMI. Все остальные образцы были исследованы в AFDIL.

Методы

Выделение и анализ ДНК были проведены тремя независимыми группами, специализирующимися на изучении древней ДНК и работающие в условиях, соответствующих требованиям. Специалисты из отдела AFDIL по работе с митохондриальной ДНК (Mark J. Wadhams, Suni Edson, Kerry Maynard) работали в лаборатории American Society of Crime Lab Directors (ASCLD) и проводили исследования только митохондриальной ДНК, следуя стандартным протоколам. Один специалист из исследовательской секции (Odile Loreille) в отдельной лаборатории, используемой только для изучения древней ДНК и занималась STR-анализами. Наконец, группа GMI (Harry Niederstätter, Cordula Berger, Burkhard Burger) использовали лабораторию ISO 17025 для репликативных исследований мтДНК и STR локусов. Во всех лабораториях на всех стадиях в течение всего времени проводился контроль на контаминацию во время пре-и пост ПЦР. Материалы и оборудование постоянно обрабатывались 10% раствором отбеливателя и облучались ультрафиолетовыми лучами 254 nm от 10 до 45 минут.

Исследования во всех трёх лабораториях проводились в присутствии двух Российских учёных из лаборатории Свердловского областного бюро судебно-медицинской экспертизы (Екатеринбург): Тамара Цитович и Наталья Бандуренко в AFDIL; и Елена Трынова и Елена Вылегжанина в GMI.

Подготовка образцов

В AFDIL, все образцы сначала были очищены снаружи алюминиевыми наждачными насадками с помощью дрели (Dremel, Racine, WI), обрабатывали свободной от ДНК водой и абсолютным спиртом и высушивали в стерильном вытяжном шкафу в течение ночи. На следующий день образцы были измельчены до порошкообразного состояния стальными лезвиями в чистых и свободных от ДНК чашках Waring MC2 (Waring, Torrington, CT).

В GMI, образцы костей и зуба предварительно подвергались механической очистке обработанной в ультрафиолетовых лучах наждачной бумагой и (или) стерильными скальпелями с последующим замачиванием на 20 минут в растворе гипохлорита ($\geq 4\%$ активного хлора) и на следующем этапе отмывание стерильной водой и абсолютным спиртом. Очищенные образцы были высушены в ламинарном вытяжном шкафу в течение ночи и в конце 15 минут обрабатывали ультрафиолетовыми лучами. Сухие образцы были измельчены стерильной зубной дрелью.

Выделение ДНК

В GMI выделение ДНК проводили также как в секции исследования мтДНК (Loreille *et al.*) [5], но в GMI добавили на заключительном этапе очистку колонками QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) в соответствии с инструкцией производителя. В AFDIL учёные слегка изменили протокол и исключили органическое выделение. [6]. 100 и 400mg мелкого костного порошка как сказано в “инструкции к реагентам” были инкубированы и осторожно перемешаны в 3мл экстракционного буфера (EDTA 0.5 M, 0,5 % лаурил-саркозинат) и 100 мкл. протеиназы K (20 мг/мл.) в течение ночи при t 56 . Пробирки центрифугировали 3 мин. При 4 000 g, экстракционный буфер переносили в Центрикон 30 (Millipore Corp., Bedford, MA) и концентрировали до конечного объема 100 мкл. Раствор переносили в чистую пробирку и очищали с помощью MinElute PSR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA). Конечный объем варьировал от 25 мкл. до 100 мкл.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ДНК

Содержание митохондриальной ДНК в каждом исследованном образце GMI определялось количественной реакцией ПЦР в реальном времени, следуя подробному протоколу (7). Количество ядерной ДНК определялось с помощью количественного специального анализа AluYb8, описанного Walker (8), включающий внутренний положительный контроль для определения наличия ингибиторов реакции ПЦР в экстрактах ДНК.

АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

В GMI, пять параллельных повторов средних ампликонов содержащих от 285 до 444 пн в двух сложных ПЦР анализах и осторожно (внимательно) отобранные маленькие ампликоны были амплифицированы и секвенированы с ПЦР - праймерами достигнуты одинаковые результаты (согласие) – обнаруживающие полный двойной сиквенс, охватывающий весь контрольный регион. Секвенирование было выполнено в соответствии Berger и Parson (9) и Eichmann и Parson (10).

Группа AFDIL амплифицировала мтДНК другой амплификационной стратегией, описанной Edson (11). Гипервариабельный регион 1 (HV1), 2 (HV11), и 3 (HV111) mini – вариабельный регион 1 (MVR1) были амплифицированы для каждого образца, насколько позволяет качество образцов.

Размер ампликонов варьировал от 126 до 440 пн. Все продукты после - ПЦР, включая контроли, были очищены ExoSAP – IT (USB Co., Cleveland, OH) и очищены обычным секвенированием с помощью набора Big Dye Terminator Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Продукты сиквенса были очищены с помощью Performa[®] DTR Ultra 96-well plates (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) и осадок высушен в вакуумном концентраторе.

Осадок растворяли с помощью смеси формамид/ ЭДТА (3:1) и затем загружали в генетический анализатор Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer. Была получена линия сложного (многокомпонентного) сиквенса и достроена

(дополнена) с помощью программы Sequencher software v4.7 (GeneCodes, Ann Arbor, Michigan).

Расхождения (разницу) проверяли с использованием последовательности Cambridge Reference Sequence [12, 13], которая определена и используется для поиска в базе данных мтДНК.

АУТОСОМНЫЙ И Y – STR АНАЛИЗ

STR тестирование проводилось с несколькими имеющимися стандартными коммерческими наборами. Как GMI так и AFDIL использовали AmpFISTR Identifiler, AmpFISTR MiniFiler и AmpFISTR Yfiler PCR amplification kits (Applied Biosystems). Для анализа образца кости № 147 также использовался AmpFISTR SEFiler amplification kit (Applied Biosystems). GMI следовали протоколу изготовителей, а также использовали 34 цикла амплификации с наборами AmpFISTR Identifiler and AmpFISTR Yfiler. AFDIL использовал низкокопийный подход с наборами AmpFISTR Identifiler and AmpFISTR Yfiler PCR amplification kits и двойную рекомендуемую концентрацию *AmpliTag* и 6 дополнительных ПЦР циклов. ПЦР амплификацию с набором AmpFISTR MiniFiler kit AFDIL следовали протоколу изготовителей. Когда было необходимо, и GMI, и AFDIL использовали свои опробированные (испытанные) miniSTR. Все амплифицированные STR и Y – STR продукты были проанализированы в одном из двух генетических анализаторов 3100 или 3130x/ Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Анализ

данных был проведен с помощью программы GeneScan software v3.7 и Genotyper v3.7NT или Genemapper[®] v3.2. Размер фрагментов определялся с помощью внутреннего размерного стандарта (GeneScan-500 LIZ), для правильного обозначения аллелей ампликоны сравнивались с предусмотренным аллельным лэддером (AmpFISTR Identifiler, AmpFISTR MiniFiler и AmpFISTR Yfiler allelic ladders).

АНАЛИЗ ДАННЫХ И СТАТИСТИЧЕСКИЕ РАСЧЕТЫ

Для сохранения независимости исследования проводились в разных лабораториях; результаты не переносились из одной лаборатории в другую в течение всего периода исследования. Как только исследования завершились и в GMI и в AFDIL, электрофореграммы полученных данных были сведены в таблицы и отправлены независимому ученому (Peter Gill, University of Strathclyde).

Мы определяли правильность аутомных STR данных с помощью отношения вероятности, где оцениваются две конкурирующие гипотезы:

$$LR = \frac{\Pr(E | H_1)}{\Pr(E | H_2)}$$

Оцениваются два сценария. В числителе оценивается вероятность (Pr), основанная на гипотезе (H₁), которая предусматривает, что это останки недостающих детей Романовых. В знаменателе оценивается вероятность альтернативной, нулевой гипотезы (H₂), основанной на том, что эти останки не принадлежат детям Романовых и происходят от двух неродственных

индивидуумов. LR аутомомных STR подсчитано с помощью программы DNAView™ (Charles Brenner, Oakland, CA), выполненной по индивидуальному заказу для AFDIL (Laboratory Information Systems Application, FTI Inc., Fairfax, VA).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Количество

Определение количества ДНК в объеме более 4000 митохондриальных геномов в микролитре (mtGEs/μl) для конкретной цифры 143 п.н. принималась для образца 4.44 обычно менее 100 mtGEs/μl и образец кости 5.21 стандартно 2923 mtGEs/μl (детали в таблице 3). Наличие ингибиторов ПЦР реакции не наблюдалось. Количество ядерной ДНК для всех образцов получилось между 11 и 615 pg/μl. В отрицательных контролях Мт ДНК или ядерной ДНК не обнаружено какое-либо количество ДНК.

Таблица 3. Количество ДНК в образцах, исследованных в GMI

Samples grave 2	mtGE 143bp/μl	Qty AluYb8 (pg/μl)
146.1 (кость)	9,707	16
147 (кость)	4,934 / 4,239	37/ 29
Samples grave 1		
3.46 (кость)	60,291	186
4a (зуб)	11,279	615
4.44 (кость)	<100	12
4.51 (кость)	5,261/ 5,562	45/ 11
5.21 (кость)	2,923	11
6.14 (кость)	9,396	11
6.16 (кость)	17,794	136
7.4 (кость)	11,773	19
7.49 (кость)	16,806	49

MtGE: эквивалент митохондриального генома. Образцы 147 и 4.51 были независимо выделены дважды. В таблице показана концентрация каждого образца.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

Сначала мы анализировали останки, обнаруженные в 2007 году (Таблица 1). Мы получили полный профиль контрольного региона [16024-576] в трех образцах (144.1, 146.1 и 147). Сиквенс всех трех образцов между 16024 и 576 был подтвержден тремя независимыми группами: 16111Т, 16357С, 16519С, 263G, 315.1С, 524.1А and 524.2С.

Обычный вариант 16519 С и АС копия вставки в HVIII регионе АС повторно характеризует внешний вариант HVI/HVII для этих образцов сравнился с оригиналом мтДНК теста,[1] где эти регионы не были секвенированы. Для образцов 140, 141, 143 и 145, мы анализировали HVI [16024-16391] и HVII [35-369]. Секвенированные образцы для HVI и HVII были подтверждены для 16111Т, 16357С, 263G и 315.1С. Из двух образцов (139 and 142) не получено данных.

Затем мы воспроизвели полные профили из останков Царицы и трех ее дочерей из первого захоронения. Успешно амплифицировались все костные фрагменты, с ампликонами такого размера как 444 п.н. (GMI) или 440п.н. (AFDIL). Последовательности всех индивидуумов, ранее опубликованных результатов в HVI и HVII подтверждаются последовательностью недавно обнаруженных костных останков [1].

Чтобы оценивать частоту этой последовательности, мы сначала сосредоточились на немецкой базе данных (n=513 образцы) в пределах EDNAP

mtDNA Популяционная База данных (EMPOP; [18]), так как Царица Александра была немецкой принцессой

Мы не нашли никаких точных совпадений последовательности ни в немецкой базе данных ни в пределах 3 340 Западной Евразии в EMPOP. Наконец, мы отыскали гаплотип Царицы с помощью глобальной базы данных mtDNA, содержащей 23 627 людей (4 839 людей в американской базе данных SWGDAM mtDNA и 18 788 людей от внутренней базы данных Секции Исследования AFDIL на 02/26/09) и не нашли ни одного совпадения, что делает эту последовательность редкой. Последовательность полного контрольного региона [16024-576] останков Царя Николая II (зуб от скелета #4) была также определена и соответствовала изданным данным HVI и HVII от Gill и др. [1] и Иванова и др. [2]: 16126C, 16169Y, 16294T, 16296T, 16519C, 73G, 263G, 315.1C с гетероплазмией в позиции 16519, характерным в полученном недавно контрольном регионе.

Точка гетероплазмии в позиции 16169 - присутствие Т с С является главным компонентом. (Рисунок 2).

AFIP-CME-DNA (40-31a)
 SUBJECT: DNA Identification of Romanov Children Remains

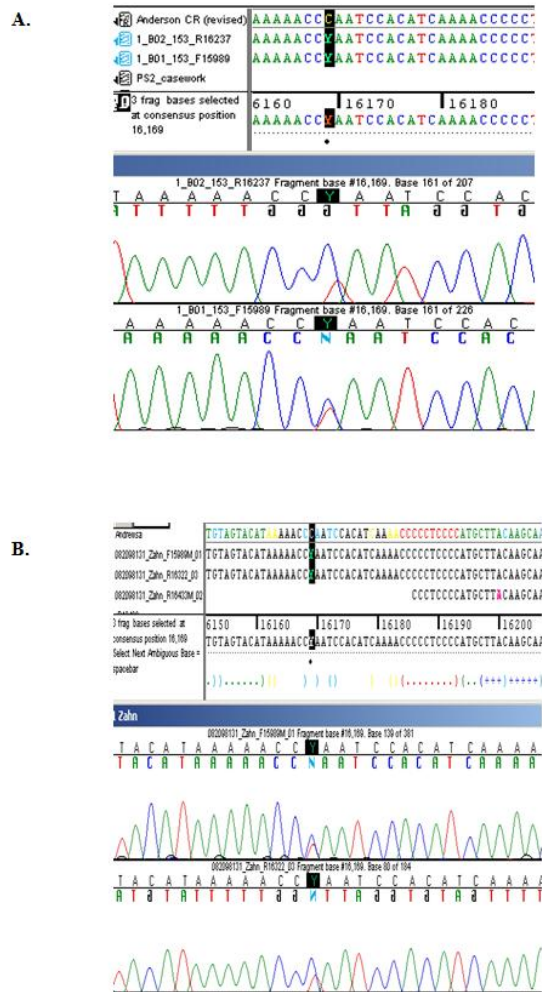


Рис 2. Скриншот 16169 С/Т гетероплазмии имеющейся у царя Николая II, используется в учебниках для начинающих. (А) Результаты, полученные в AFDIL. (В) Результаты, полученные GMI.

Чтобы оценивать частоту гаплотипа Царя, мы сначала сосредоточились на базе данных Дании (n=209 образцы) в пределах базы данных EMPOP, так как мать Царя была датской принцессой. Мы не нашли никаких точных совпадений последовательности в датской базе данных. Когда принималась во внимание 16169С (соответствие rCRS) то среди 3 340 последовательностей Западной Евразии в базе данных EMPOP соответствовало 3 последовательности (0.09 %),

Поиск AFDIL + SWGDAM mtDNA база данных показал 19 совпадений ($19/23,627 = 0.08 \%$) гаплотипа Царя, когда рассматривался 16169C. Никакие совпадения с гаплотипом Царя + 16169T не были найдены. Относительная частота mtDNA гаплотипа Царя, как полагали, была редкой.

ИССЛЕДОВАНИЕ АУТОСОМНОЙ ДНК

Наиболее сохранившиеся костные фрагменты были идентифицированы при антропологическом исследовании и два костных фрагмента от бедренной кости (146.1 and 147) были отобраны для исследования ядерной ДНК. Антрополог (Энтони Фалсетти), основываясь на размере, форме головки бедренной кости и угла шейки решил, что фрагмент 147 вероятно принадлежал женщине.

Результаты для образцов 146.1 и 147 показаны в таблице 3. Каждая аллель была копирована не менее семи раз в каждой лаборатории. Результаты маркера amelogenin показали, что образец 146.1 принадлежит мужчине и подтвердили, что образец 147 произошел от женщины (иллюстрации 3 и 4). Мы не нашли никакой контаминации среди полученных профилей STR. Фактически, среди 1458 аллелей всех аутосомных и Y-STR локусов, которые превышают порог чувствительности, установленный в AFDIL (100 RFUs для аллелей гетерозигот и 200 RFUs для аллелей гомозигот) только 6 аллелей (0.4 %) рассматривались как ложные или артефакты.

Половина этих ложных аллелей встречается в позициях заикания подлинной аллели - указывая, что наиболее вероятно они были получены на ранних циклах амплификации ПЦР.

Table 3. Autosomal STR Genotypes for the Romanov Family.

Marker	Sample 4.3 Tsar Nicholas II	Sample 7.4 Tsarina Alexandra	Sample 3.46 Olga	Sample 5.21 Tatiana	Sample 6.14 Anastasiya	Sample 147 Maria	Sample 146.1 Alexei
Amelog	X, Y	X, X	X, X	X, X	X, X	X, X	X, Y
D3S1358	14, 17	16, 18	17, 18	17, 18	16, 17	17, 18	14, 18
TH01	7, 9.3	8, 8	8, 9.3	7, 8	8, 9.3	7, 8	8, 9.3
D21S11	32.2, 33.2	30, 32.2	30, 33.2	32.2, 33.2	30, 33.2	30, 33.2	32.2, 33.2
D18S51	12, 17	12, 13	12, 12	12, 12	13, 17	12, 17	12, 17
D5S818	12, 12	12, 12	12, 12	12, 12	12, 12	12, 12	12, 12
D13S317	11, 12	11, 11	11, 11	11, 11	11, 11	11, 11	11, 12
D7S820	12, 12	10, 12	12, 12	10, 12	12, 12	10, 12	12, 12
D16S539	11, 14	9, 11	11, 11	11, 11	11, 14	9, 11	11, 14
CSF1PO	10, 12	11, 12	11, 12	11, 12	10, 11	10, 12	10, 12
D2S1338	17, 25	19, 23	17, 19	23, 25	17, 19	17, 23	23, 25
vWA	15, 16	15, 16	15, 16	15, 16	15, 16	15, 16	15, 16
D8S1179	13, 15	16, 16	13, 16	15, 16	13, 16	15, 16	15, 16
TPOX	8, 8	8, 8	8, 8	8, 8	8, 8	8, 8	8, 8
FGA	20, 22	20, 20	20, 22	20, 20	20, 22	20, 22	20, 22
D19S433	13, 13.2	13, 16.2	13.2, 16.2	13.2, 16.2	13, 16.2	13, 13	13, 13.2

Анализ STR показал наличие двух человек и среди двух профилей была отмечена очень высокая степень разделения аллелей, подтверждая, что люди были близкими родственниками.

Индекс сибсов (СИ) был вычислен, определяя отношение вероятности (LR) гипотезы (H1), доказывающей, что образцы 146.1 и 147 являются родственниками по сравнению с альтернативной гипотезой, утверждающей, что эти образцы

AFIP-CME-DNA (40-31a)
SUBJECT: DNA Identification of Romanov Children Remains

принадлежат двум неродственным людям (H2). Индекс сибсов (СИ) был получен 5.6 миллионов в пользу гипотезы H1. Другими словами, очевидность того, что ДНК в образцах 146.1 и 147 принадлежит родственникам в 5.6 миллионов раз более вероятно, чем эти образцы произошли от двух людей, не состоящих в родственной связи.



Рис. 3. STR профиль для образца 146.1 – образец мужского пола.

AFIP-CME-DNA (40-31a)

SUBJECT: DNA Identification of Romanov Children Remains

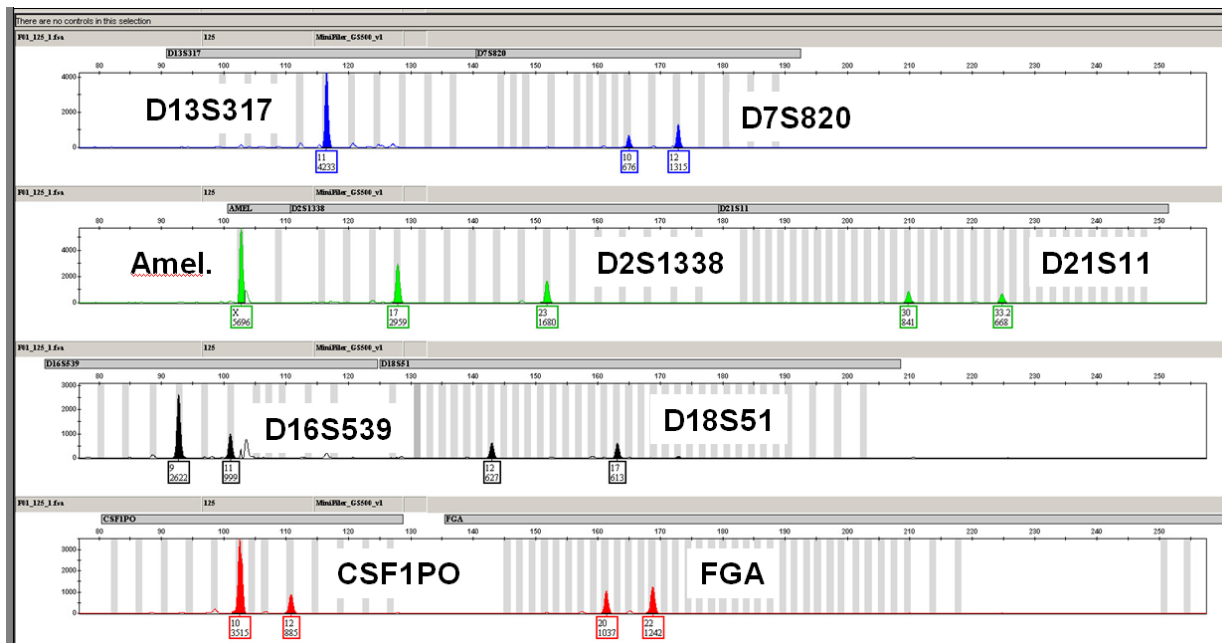


Рисунок 4. STR-профиль образца 147 – женский образец.

Чтобы подтвердить, что эти двое являлись детьми одних родителей и также имели родственные связи с Романовыми, чьи останки были извлечены из первого массового захоронения, мы провели STR-тестирование предоставленных скелетных фрагментов других пяти членов царской семьи (Таблица 2).

Результаты показаны в таблице 3. Профили для локуса vWA совпали с данными, опубликованным Gill P. с соавторами [1], протестированными тетра nukлеотидными маркерами [19]. В локусе TH01 мы получили аллели 7 и 9.3 у царя, идентифицированные как генотип 7/10 у Gill P. с соавторами [1]. Так же и у одной из дочерей генотип TH01 был ранее определен как 8/10, а сейчас как 8/9.3. Во времена публикации Gill P. с соавторами [1] существовала практика объединять аллели 9.3 и 10 в локусе TH01 и использовать обозначение '10' как

стандартную номенклатуру для обоих аллелей. Позже ДНК-Комиссия Международного общества Судебно-Медицинских Гемогенетиков (ISFH) рекомендовала использовать обозначение "9.3" для описания микроварианта аллеля в локусе TH01 [20]. После 2000 года аллель "9.3" в локусе TH01 стала использоваться во всех профилях вносимых в национальную базу данных ДНК Великобритании. Это незначительное (историческое) различие в номенклатуре не оказывает влияния при наших сравнениях. Все генотипы в локусах vWA и TH01 были полностью согласующимися с останками из первого захоронения.

Все дополнительные микросателлиты проанализированные в этом исследовании подтвердили родительскую связь между останками скелетов царя Николая II и Александры и другими останками, протестированными в этом исследовании. Все аллели 3-х дочерей из первого захоронения могут быть объяснены сочетанием половины аллелей из профиля Николая и половины аллелей из профиля Александры. Важно и то, что оба скелетных останка из недавно найденного захоронения показали те же самые половины аллелей распределенные из генотипов Николая и Александры как предполагаемых родителей. Когда мы рассчитали величину отношения правдоподобия (LR) гипотезы (H_1) что образцы 146.1 и 147 являются детьми царя Николая II и царицы Александры (и сибсами трех принцесс из первого захоронения) в сравнении с альтернативной гипотезой, что эти образцы являются останками людей совершенно посторонних для семьи Романовых (H_2), то мы получили, что данные ДНК исследования увеличивают вероятность того, что образец 147 является

дочерью царя Николая II и царицы Александры в 4.36 триллионов раз, а вероятность того, что образец 146.1 является сыном царя Николая II и царицы Александры - более чем в 80 триллионов раз, чем вероятность того, что эти образцы принадлежат 2-м людям, не состоящим в родственной связи с семьёй Романовых.

Анализ Y-STR

В заключении чтобы сравнить профили царя и его сына с ныне живущими потомками по отцовской линии наследования семьи Романовых, мы проводили исследование Y-STR на скелетном материале. Сначала мы получили 17-локусный Y-STR-профиль из образца 146.1 и затем из зуба царя. Наконец в отдельной лаборатории мы получили профиль принца Андрея Андреевича Романова – дальнего родственника царя Николая II (Рисунок 5). Пример четырех маркеров показан на рисунке 6. Мы отметили точное совпадение между всеми тремя мужчинами по всем 17 маркерам (Таблица 4). Чтобы оценить значимость этого совпадения, мы проанализировали Y-STR-гаплотип в базе данных 4,163 гаплотипов индивидуумов (<http://usystrdatabase.org/>) и не нашли ни одного совпадения. Кроме этого, был проведен поиск в базе данных YHRD (<http://www.yhrd.org>) и совпадающего гаплотипа не найдено среди 17-локусных профилей и 10,243 гаплотипов включающих как минимум 2,068 индивидуумов из Евразийской метапопуляции.

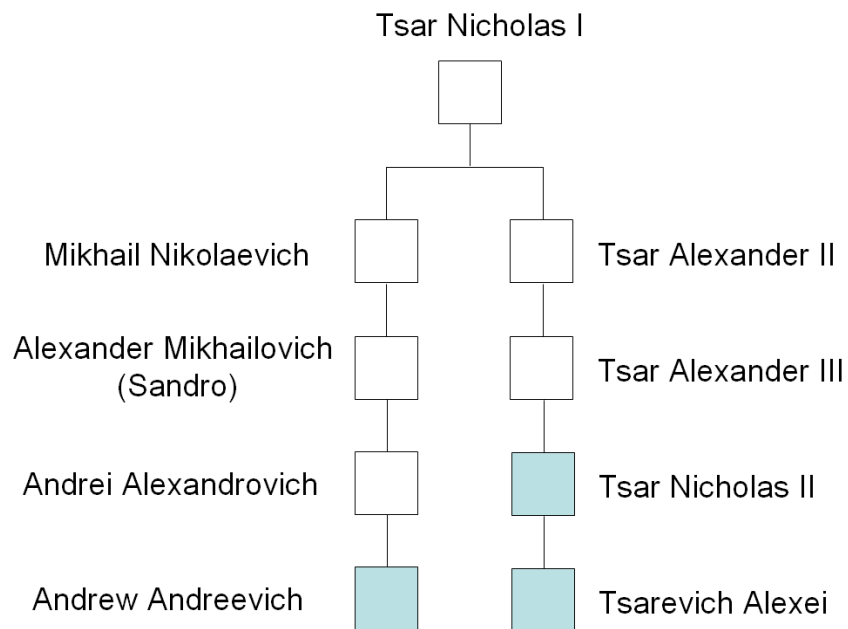


Рисунок 5. Y-генеалогия Андрея Романова и царя Николая II

AFIP-CME-DNA (40-31a)

SUBJECT: DNA Identification of Romanov Children Remains

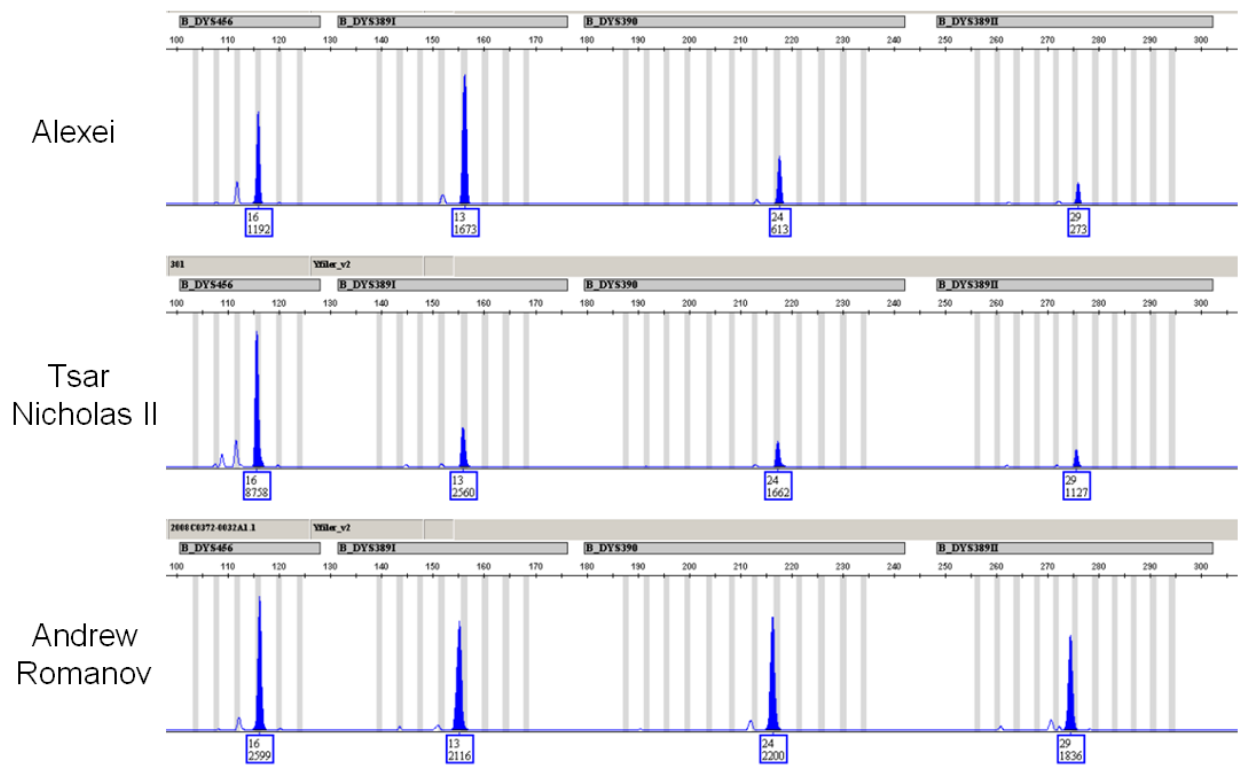


Рисунок 6. Пример четырех Y-STR-маркеров трех родственников Романовых. Каждая панель это снимок в синем красителе набора Y-File (Applied Biosystems, Foster City, CA). Верхняя панель получена их скелетных останков Алексея, средняя панель получена из зуба образца царя Николая II, и нижняя панель получена у принца Андрея Андреевича Романова. Локусы (слева направо): DYS456 (16 повторов), DYS389I (13 повторов), DYS390 (24 повтора), и DYS389II (29 повторов).

Таблица 4. Y-STR-гаплотипы Николая, Алексея и Андрея Романова.

DYS19	DYS389I	DYS389II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393	DYS385a/b
14	13	29	24	10	13	13	11, 14
DYS438	DYS439	DYS437	DYS448	DYS456	DYS458	DYS635	YGATAH4
12	11	15	19	16	17	24	12

Обсуждение

Подлинная судьба семьи Романовых была неизвестна для всех за исключением группы людей почти 70 лет. Gill с соавторами [1] провели первое ДНК – исследование после предварительных антропологических исследований первого захоронения. Позже достоверность результатов была подвергнута сомнениям Knight с соавторами [21], не доверявшим подлинности последовательностей полученных с помощью ПЦР-стратегии. Knight аргументировал это тем, что размеры ампликонов были необычно длинными, и поэтому результаты были ненадежными. Hofreiter с соавторами [22], и Gill и Hagelberg [23] выдвигали опровержение мнениям, придуманным Knight с соавторами [21]. Тем не менее, Knight с соавторами [24] настаивал: “ Может быть наработан только ампликон длиной 221п.о. (возможно из эндогенной деградированной ДНК-матрицы), но не продукт длиной 400 п.о..... результат(ы) у (Gill *et al.*) являются не правдоподобными”. Исходя из нашего опыта в большинстве случаев высоко деградированные матрицы мт-ДНК часто амплифицируются только с длиной ампликонов 270 п.о. или меньше. Тем не менее, получив уникальную возможность протестировать заново материал первоначально оцененный Gill с соавторами [1], мы успешно смогли амплифицировать фрагменты длиной 444п.о. и 440п.о. используя классическую А-стратегию ДНК амплификации (увеличение числа циклов, добавление BSA, и добавление полимеразы), см. рисунок 7. Было возможно не только амплифицировать мт-ДНК до длины 444 п.о., но мы также успешно

AFIP-CME-DNA (40-31a)

SUBJECT: DNA Identification of Romanov Children Remains

амплифицировали аллели высокого молекулярного веса при тестировании ядерных STRs (свыше ~375 п.о. для аутосомных маркеров и свыше ~335 п.о. для Y-хромосомных маркеров). Очень вероятно, что экстремально холодный климат в Екатеринбурге, где земля обычно мерзлая с сентября по апрель, обеспечил идеальные условия для сохранения останков.

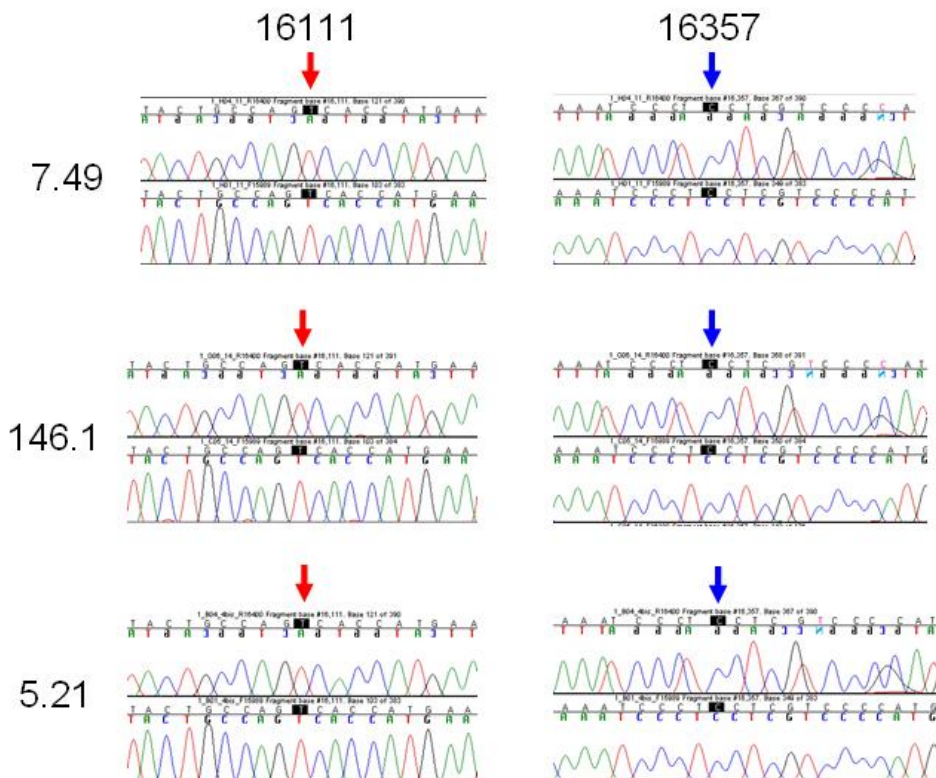
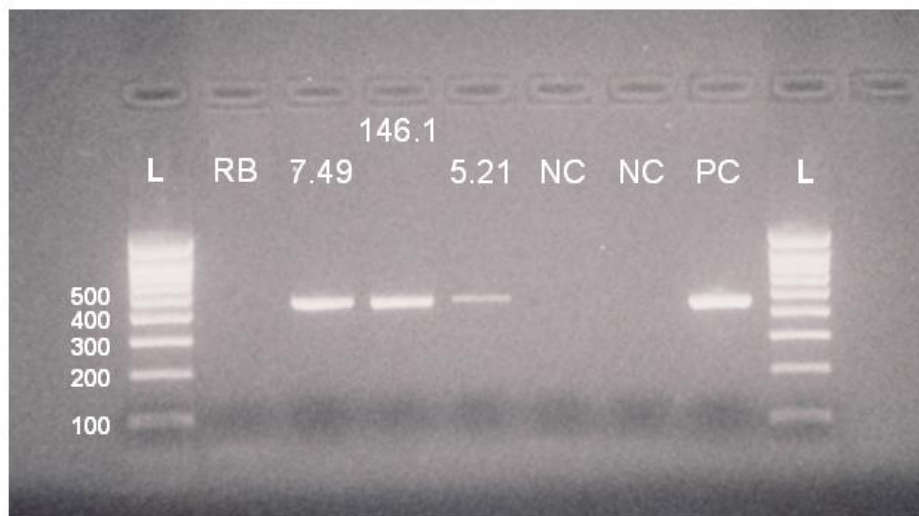


Рисунок 7. Фореграммы 16111 С-Тварианта и 16357 Т-С вариантов от трех образцов секвенированных из амплифицированных фрагментов длиной 440п.о. Легенда для геля: L=Лэддер, RB=Контроль Реагентов, 7.49=Образец царицы Александры, 46.1=Образец Алексея, 5.21=Образец Татьяны, NC=Негативный Контроль, PC=Положительный Контроль, L=Лэддер.

Ещё одним предметом спора, вызвавшим сомнения насчет первых ДНК-исследований, была точковая гетероплазмия в позиции 16169 мт-ДНК последовательности царя. В то время это была спорная находка. Раньше до середины 1990-х полагали, что точковая гетероплазмия - это крайне редкий феномен и трудно было объяснить существование 2-х различных гаплотипов мт-ДНК у одного индивида. Независимое тестирование образцов было очень важно для того, чтобы обеспечить необходимой конфиденциальностью, чтобы результаты были обоснованными и вескими. Именно поэтому результаты мт-ДНК приписанные царю были подтверждены в независимой лаборатории Erika Hagelberg с соавторами в Кембриджском Университете и опубликованы в 1994 году [1]. Кроме этого, точковая гетероплазмия в позиции 16169 Т/С подтвердилась в лаборатории AFDIL у костного образца царя Николая II и его брата великого князя Георгия [2]. В итоге гетероплазмия определилась и подтвердилась еще раз в данном исследовании лабораториями AFDIL и GMI (Рисунок 2).

Сегодня наличие гетероплазмии считается довольно распространенным явлением, хотя конкретный случай специфической замены в позиции 16169 само по себе явление довольно редкое [25]. В нашей внутренней базе данных AFDIL мт-ДНК среди 18,788 гаплотипов мы обнаружили три примера (0.016%) точковой

гетероплазмии в позиции 16169 . И лишь один образец западно-европейского происхождения относится к той же гаплогруппе Т* что и царь, но отличается от Николая на 7 нуклеотидов в контрольном регионе. Поэтому после многочисленных научных наблюдений за этим редким случаем гетероплазмии, его можно рассматривать как очень сильный индикатор установления родства.

Два вопроса сформулированных Gilbert с соавторами [26] для того, чтобы оценить результаты ДНК-исследований для исследователей, читателей и рецензентов звучали так: “Какая информация представленная здесь делает результаты и/или выводы правдоподобными?” и “Существуют ли какие-либо причины не верить этому?” Мы использовали три ДНК-маркерных системы, чтобы изложить наши результаты.

Только результаты **мт-ДНК** могут рассматриваться как окончательные. Новые образцы полностью соответствовали данным мт-ДНК царицы Александры (а также данным HVI и HVII ныне живущих родственников, и HRH принца Филиппа), указывая на то, что эти образцы состояли с ней в родственной связи по материнской линии. Если сюда присоединить информацию, полученную антропологами об этих образцах: а именно то, что один из образцов найденных во втором захоронении наиболее вероятно был бедренной костью молодой женщины (образец 147), мы можем сделать вывод, что эти образцы являются отсутствующими детьми царицы, с того момента как бедренные кости царицы и её трёх других детей были обнаружены и установлены в первом захоронении.

Аутосомные STR генотипы определялись, чтобы составить генеалогическое древо семьи Романовых. ДНК-профили двух образцов из второго захоронения полностью вписываются в фамильное древо царя и царицы со всеми аллелями, чье происхождение в обоих образцах объясняется Менделевским наследованием.

17-локусный **Y-STR** гаплотип, полученный из останков царя Николая II полностью совпадает с Y-STR гаплотипом, полученным из бедренной кости мужского образца (образец 146.1), найденного во втором захоронении. Тот же 17-локусный гаплотип был установлен также и у ныне живущих родственников Романовых.

После анализа последовательностей митохондриальной ДНК, аутосомных STR и Y-STR профилей всех останков состоящих в родственной связи с ныне живущими родственниками Романовых, мы ещё сравнили наши STR-профили царя Николая II с профилем полученным в Свердловском областном бюро судебно-медицинской экспертизы (г. Екатеринбург) из пятна крови на рубашке Николая, которую он носил будучи ещё юношей. 29 апреля 1891 года во время тура в городе Отцу, Япония, царевич Николай Романов был ранен японским полицейским при покушении на его жизнь [27]. Николай получил два удара в голову саблей атакующего, до того как нападающий был схвачен. Чудом Николай пережил нападение, а окровавленная рубашка, в которую он был одет в тот день,

вернулась в Россию как реликвия покушения. Со временем рубашка была помещена в хранилище музея Эрмитаж в г. Санкт-Петербург. Летом 2008 года эксперты Свердловского областного бюро судебно-медицинской экспертизы взяли 3 образца из пятен крови на рубашке. Один из образцов дал полные аутомные и Y-STR профили [28]. Два других образца дали частичные профили как аутомной ДНК, так и Y-STR, но все аллели в неполных профилях полностью совпали с аллелями полного профиля. Мы сравнили наши ДНК-профили, полученные из зуба Николая II с профилем, полученным из пятна крови, и установили полное совпадение по всем локусам. Впервые сейчас существует связь между доказательствами: прижизненным – ДНК-профилем Николая II с посмертным – скелетными останками из первого захоронения.

Взятые все вместе результаты и выводы свидетельствуют в пользу гипотезы, что образцы, изъятые из второго захоронения, являются отсутствующими детьми царя Николая II и царицы Александры. Необходимо упомянуть, что хорошо освещенный в литературе спор [4] о том, какую дочь нашли во втором захоронении Марию (согласно версии русских экспертов) или Анастасию (согласно версии американских экспертов), не может быть решен на основании результатов ДНК-исследований представленных здесь. В отсутствии сравнительных образцов каждой сестры, мы можем только убедительно идентифицировать Алексея – только сына Николая и Александры.

Около 90 лет судьба семьи Романовых была окутана тайной. В течении многих лет после казни семьи Советское правительство не признавало факта

смерти всех Романовых. Всё это время шли разговоры о том, что кто-то из семьи сбежал от палачей и уехал из России. Наиболее известной претенденткой была Анна Андерсон, польская крестьянка, которая убедила многих, что она Анастасия [4]. С открытием первого захоронения и последующими ДНК исследованиями Анна Андерсон была разоблачена, как самозванка [29]. Фактически в 1918 более 200 людей претендовали на то, чтобы быть одними из пяти детей Романовых (<http://www.romanov-memorial.com/pretenders.htm>). Здесь мы смогли дать полный отчет о всей семье Романовых и можем заключить, что никто из семьи не избежал казни в ранние утренние часы 17 июля 1918.

Ссылки

[1] Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, et al. (1994) Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet* 6: 130-136.

[2] Ivanov PL, Wadhams MJ, Roby RK, Holland MM, Weedn VW, et al. (1996) Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat Genet* 12: 417-420.

[3] Zhivotovsky LA (1999) Recognition of the remains of Tsar Nicholas II and his family: a case of premature identification? *Ann Hum Biol* 26: 569-77.

[4] Massie RK (1995) *The Romanovs: The Final Chapter*. New York: Random House 308 p.

[5] Loreille OM, Diegoli TM, Irwin JA, Coble MD, Parsons TJ (2007) High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Sci Int Genet* 1: 191-195.

[6] Loreille O.M, Parr R.L, McGregor K.A, Fitzpatrick C.M, Lyon C, et al. Identification of 60 year-old mummified Human remains discovered in an Alaskan glacier. *J Forensic Sci.*, manuscript accepted.

[7] Niederstätter H, Köchl S, Grubwieser P, Pavlic M, Steinlechner M, et al. (2007) A modular real-time PCR concept for determining the quantity and quality of human nuclear and mitochondrial DNA. *Forensic Sci Int Genet* 1: 29-34.

[8] Walker JA, Hedges DJ, Perodeau BP, Landry KE, Stoilova N, et al. (2005) Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous quantitation of human nuclear, mitochondrial, and male Y-chromosome DNA: application in human identification. *Anal Biochem* 337: 89-97.

[9] Berger C and Parson W. Mini-midi-mito: adapting the amplification and sequencing strategy to the DNA degradation state of crime scene samples. Submitted.

[10] Eichmann C and Parson W (2008) 'Mitominis': multiplex PCR analysis of reduced size amplicons for compound sequence analysis of the entire mtDNA control region in highly degraded samples. *Int J Legal Med* 122: 385-388.

[11] Edson SM, Ross JR, Coble MD, Parsons TJ, Barritt SM (2004) Naming the dead—confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains. *Forensic Sci Rev* 16: 64–89.

[12] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, et al. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.

[13] Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, et al. (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23: 147.

[14] Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J (2000) An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci Int* 112: 17-40.

[15] Irwin JA, Leney MD, Loreille O, Barritt SM, Christensen AF, et al. (2007) Application of low copy number STR typing to the identification of aged, degraded skeletal remains. *J Forensic Sci* 52: 1322-1327.

[16] Butler JM, Shen Y, McCord BR. (2003) The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci.* 48: 1054-1064.

[17] Grubwieser P, Mühlmann R, Berger B, Niederstätter H, Pavlic M, et al. (2006) A new "miniSTR-multiplex" displaying reduced amplicon lengths for the analysis of degraded DNA. *Int J Legal Med* 120: 115-120.

[18] Parson W and Dür A (2007) EMPOP--a forensic mtDNA database. *Forensic Sci Int Genet* 1: 88-92.

[19] Kimpton C, Fisher D, Watson S, Adams M, Urquhart A, et al. (1994) Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci. *Int J Legal Med* 106: 302-311.

[20] Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, et al. (1997) DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Forensic Sci Int* 87: 179-184.

[21] Knight A, Zhivotovsky LA, Kass DH, Litwin DE, Green LD, et al. (2004) Molecular, forensic and haplotypic inconsistencies regarding the identity of the Ekaterinburg remains. *Ann Hum Biol* 31:129-138.

[22] Hofreiter M, Loreille O, Ferriola D, Parsons TJ (2004) Ongoing controversy over Romanov remains. *Science* 306: 407–408.

[23] Gill P and Hagelberg E (2004) Ongoing controversy over Romanov remains. *Science* 306: 408–409.

AFIP-CME-DNA (40-31a)

SUBJECT: DNA Identification of Romanov Children Remains

[24] Knight A, Zhivotovsky LA, Kass DH, Litwin DE, Green LD, White PS (2004) Ongoing controversy over Romanov remains. *Science* 306: 409-410.

[25] Melton T (2004) Mitochondrial DNA heteroplasmy. *Forensic Sci Rev* 16: 2-20.

[26] Gilbert MT, Bandelt HJ, Hofreiter M, Barnes I (2005) Assessing ancient DNA studies. *Trends Ecol Evol* 20: 541-544.

[27] Radzinsky E (1993) *The Last Tsar: The Life and Death of Nicholas II*. New York: Anchor Books 475 p.

[28] Trynova E, Tsitovich T, Vylegzhanina E, Bandurenko N, Parson W, et al. Forensic DNA profiling of an 1891 blood-stained shirt from Tsar Nicholas II. Submitted.

[29] Gill P, Kimpton C, Aliston-Greiner R, Sullivan K, Stoneking M, et al. (1995) Establishing the identity of Anna Anderson Manahan. *Nat Genet* 9: 9-10.



Michael D. Coble, PhD
Research Section Chief
Armed Forces DNA Identification Laboratory
1413 Research Blvd.
Rockville, MD 20850

Технический перевод осуществлен врачами судебно-медицинскими экспертами:

Цитович Т.Н., Бандуренко Н.А., Трыновой Е.Г.