

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA ANTROPOLOGIE A GENETIKY ČLOVĚKA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Forenzní molekulárně genetická analýza živočichů

Tereza Šlapalová

Školitel: Mgr. Halina Šimková

2009/2010

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce Mgr. Halině Šimkové za odborné rady a přátelský přístup.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury a souhlasím s jejím zveřejněním.

V Praze dne 9. 8. 2010

.....
Tereza Šlapalová

Obsah:

1. Úvod.	7
2. Teoretický základ	8
2.1 Forezní DNA analýza – historie a metody	8
2.2 Skladba genomu živočichů	9
2.3 Genomy a původ hlavních zájmových druhů	10
2.2.1 Původ kočky a její genom	10
2.2.2 Původ psa a jeho genom	12
3. Identifikace	13
3.1 Zjištění druhové příslušnosti	13
3.1.1 Principy	13
3.1.2 Metody	14
3.2 Identifikace živočišného jedince	16
3.2.1 Principy	16
3.2.2 Metody	16
3.3 Nejčastěji testované živočišné druhy	17
3.3.1 Kočky	17
3.3.2 Psi	19
3.3.3 Koně	21
3.3.4 Hovězí dobytek	22
4. Okruhy užití forezní DNA analýzy živočichů.	23
4.1 Kriminalistika	23
4.2 Ochrana životního prostředí.	23
4.3 Chovatelství	24
4.4 Potravinářství	25
4.5 Archeologie	25
4.6 Botanika	26
5. Kazuistika – slavné případy	27
5.1 Případ Snowball	27
5.2 Vražda Seya Ogunyemiho	29
6. Závěr	30
7. Seznam použité literatury	31

Abstrakt

Forenzní molekulárně genetická analýza živočichů zahrnuje jednak identifikaci jednotlivce a jednak identifikaci živočišného druhu. Využití nachází v kriminalistice, potravinářství, chovatelství, ochraně životního prostředí, archeologii. V kriminalistice či chovatelství se uplatňuje především individuální identifikace. Identifikace živočišného druhu se užívá zejména v oblastech ochrany životního prostředí, potravinářství a archeologie. Nejběžněji testovanými živočišnými druhy jsou psi, kočky, koně a hovězí dobytek.

Nejčastější metodou identifikace druhu je sekvenace genu pro podjednotku cytochromu b v mtDNA. Díky mtDNA lze určit druh, ale není možné takto rozlišit jedince ze stejné maternální linie. Individuální identifikace jedince probíhá na principu porovnávání vysoce polymorfních segmentů DNA.

Mezi přelomové případy užití forenzní DNA analýzy živočichů patří případ Snowball, který se odehrál roku 1994. Vrah byl usvědčen díky tomu, že chlupy, obsahující DNA jeho kočky Snowball, byly nalezeny na bundě spolu se skvrnami od krve oběti.

Vražda Seya Ogunyemiho (z roku 2009) je první případ, kdy byl v Británii usvědčen vrah podle DNA psa.

Klíčová slova: Forenzní DNA analýza, kočka domácí, pes domácí, identifikace živočišných druhů, individuální identifikace živočichů.

Abstract

Forensic molecular genetic analysis of animals includes identification of individuals as well as identification of species. It is being used in criminalistics, food-processing industry, breeding, environment protection and archeology. The identification of individuals is mostly employed in criminalistics and in breeding. The identification of species is being used in environmental protection, food-processing industry and archeology. The animals tested most often are dogs, cats, horses and cattle.

The most common method of the identification of species is gene sequencing of sub-unit of cytochrome b in mtDNA. Thanks to the mtDNA it is possible to determine the species, but it is not possible to distinguish individual from the same maternal line. The individual identification is based on a principle of comparison of highly polymorph segments of DNA.

Amongst the most breaking-through cases of forensic DNA analysis usage belongs the Snowball case, which happened in 1994. A murderer was found guilty thanks to hair (DNA) of his cat Snowball which were found on a jacket with bloodstains of a victim.

Murder of Sey Ogunyemi (2009) is the first case in the United Kingdom when a murderer was found guilty based on DNA of a dog.

Key words: Forensic DNA analysis, cat, dog, species identification, animal identification

Použité zkratky

bp	pár bází
CFA	The Cat Fanciers' Association
CITES	Úmluva o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a rostlin (<i>Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
mtDNA	mitochondriální DNA
nDNA	jaderná DNA
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
STR	krátká tandemová repetice (<i>Short Tandem Repeat</i>)
TICA	The International Cat Association

1. Úvod

Člověk žil v kontaktu se zvířaty už od pravěku – nejprve je lovil, později některé druhy domestikoval. Zvířata mají důležitou úlohu v životě člověka - jsou chována pro maso a ostatní produkty, pro práci, či zábavu. Pes slouží jako společník, hlídač, nebo může např. vyhledávat zasypané oběti pod lavinou. Kočky původně chránily sklady potravin před drobnými hlodavci, dnes už je jejich úkolem pouze dělat člověku společnost a zpříjemňovat mu život. Dále se v domácnostech chovají např. hlodavci či ptáci.

Domestikovaná zvířata se pohybují v blízkosti člověka, a není tedy neobvyklé, že je jejich materiál nalezen na místě trestného činu. Nejoblíbenějšími, a tudíž nejtestovanějšími, domácími mazlíčky jsou psi a kočky. Ve své práci jsem se proto zaměřila nejvíce na ně. S největší pravděpodobností bude právě psí nebo kočičí materiál (nejčastěji chlupy) nalezen na místě trestného činu. Podaří-li se prokázat, z jakého konkrétního zvířete nalezený materiál pochází, pomůže to spojit pachatele s místem trestného činu. Forenzní analýza živočichů je nápomocná také při vyšetřování krádeží zvířat, podvodných záměn zvířat, či v chovatelství. Možnosti využití jsou velmi široké a v práci jsou blíže popsány.

Co se týká divokých zvířat, častěji se identifikuje živočišný druh, a to v případě podezření na nelegální obchod se živými zvířaty, anebo s produkty z nich vyrobenými. Identifikace druhu tedy nachází uplatnění všude tam, kde je nutné prověřit původ živočišného materiálu, ať už se jedná například o potraviny, turistické suvenýry, nebo třeba oděvy.

Forenzní DNA analýza živočichů je relativně nová disciplína. Tato práce vznikla jako obecné shrnutí využití, metod, více či méně známých případů, kdy byla analýza živočichů použita, a možností, které by mohly být realizovány v budoucnu.

2. Teoretický základ

2.1 Forenzní DNA analýza – historie a metody

Úkolem forenzní DNA analýzy je v případě živočichů zjistit buď individuální identifikaci jedince, nebo identifikovat druh, poddruh, varietu či plemeno. Individuální identifikace jedince se používá například v případech, kdy zvíře napadlo člověka, kdežto identifikace druhu, poddruhu, variety či plemena se užívá kupříkladu při vyšetřování nelegálního lovu zvířat a obchodu se zvířaty. DNA metody mají mnoho výhod – například se vyhýbají problémům s dominancí a recesivností. DNA markery dále nabízejí větší stabilitu oproti okolnímu prostředí a teplotě než proteiny. DNA je možno identifikovat dlouho po smrti, například u egyptských mumií a vyhynulých mamutů. Protože DNA se nachází téměř ve všech buňkách lidského těla, může testovaný materiál pocházet z jakéhokoliv zdroje buněk.

Během dekády 1985-1995 se v molekulární biologii stále více využívala revoluční technická inovace, jež je nyní téměř univerzálním nástrojem. Jedná se o polymerázovou řetězovou reakci (PCR), techniku pro amplifikaci nepatrného množství DNA (viz kpt 3.2 Identifikace živočišného jedince).

V roce 1985 byla poprvé využita DNA pro vyšetřování trestného činu. Byla použita oblast DNA, kde se několikrát opakují krátké sekvence, a počet jejich opakování se u různých osob značně liší. Metodu úspěšně demonstroval Alec Jeffreys (Jeffreys, 1985).

Profilování VNTR (proměnlivý počet tandemových repetice) je založeno na metodách, které použil Jeffreys. U VNTR se jedná o sekvence DNA o délce 8 až 80 bp (obvykle 18-35), které jsou v různých alelách tandemově opakovány. Téměř veškeré VNTR systémy jsou příliš dlouhé, a to je jeden z důvodů, proč byly nahrazeny STR. Ačkoliv VNTR obsahují více alel na lokus, STR lokusy jsou početnější a poskytují při použití většího množství lokusů stejnou rozlišovací schopnost (Butler, 2005).

STR (krátké tandemové repetice) jsou podobné VNTR tím, že jsou založeny na opakovaných sekvencích roztroušených po chromozomech. Metody interpretace STR je od VNTR liší tím, že STR systémy mají kratší jednotky opakování a nižší počet alel na lokus. Jejich menší počet, obvykle méně než 500 bp, je činí přístupnější pro PCR.

Pro tandemové repetice krátkých sekvenčních motivů (ne delších než 6 bp) se běžně používá termín mikrosatelity. Mikrosatelity byly nalezeny u všech doposud analyzovaných organismů a jsou často nacházeny s větší frekvencí, než by odpovídalo složení bází. Mikrosatelity jsou v eukaryotním genomu poměrně rovnoměrně rozloženy, ale jejich počet je nižší v kódujících

oblastech a telomerách (Goodwin, 2007).

Další důležitou součástí forenzní genetiky je testování mtDNA. Užívá se v případech, kdy je k dispozici pouze degenerovaný a na jadernou DNA chudý vzorek, anebo v případech, že je třeba identifikovat živočišný druh (například dochází-li k poškozování životního prostředí). O mtDNA se podrobněji zmíním v kapitole „Metody identifikace druhu“.

Dalším způsobem identifikace zvířat ve forenzní praxi je morfologická identifikace peří (Davies, 1970) a chlupů (Suzanski, 1988). V případě pokousání člověka zvířetem jsou předmětem zkoumání otisky zubů na kůži (Murmman, 2005). Jednou z možností je i sérologická identifikace pomocí specifických protilátek.

2.2 Skladba genomu živočichů

Termínem „genom“ označujeme veškerou genetickou informaci, včetně nekódujících oblastí, uloženou v DNA. Může být chápán jako veškerá jaderná DNA, nebo širěji, jako jaderná a mitochondriální DNA (National Center For Biotechnology Information, 2004). Jaderná DNA (deoxyribonukleová kyselina) je makromolekula, která se nachází v jádře téměř všech živých buněk (výjimku tvoří např. erytrocyty, trombocyty). Má tvar dvoušroubovice, organizované v kondenzovaném stavu do útvarů zvaných chromozomy.

Karyotyp je soubor všech chromozomů v buněčném jádře. Sada chromozomů je obvykle párová (diploidní), ale existují i výjimky (pohlavní buňky, včelí samci – trubci). U živočichů se skládá z určitého množství párových autozomálních chromozomů, a páru pohlavních chromozomů. Většina savců, včetně člověka, a některé druhy rostlin a hmyzu mají pohlavní chromozomy označeny písmeny X a Y, přičemž samice mají homogenetické pohlaví (XX), a samci mají heterogametické pohlaví (XY). V případě ptáků, některých druhů plazů, korýšů a hmyzu je tomu jinak. Pohlavní chromozomy jsou označovány jako Z a W, a samci jsou homogametičtí (ZZ), kdežto samice heterogametické (ZW) (Stiglec, 2007). Člověk má 23 párů chromozomů, které obsahují celkem cca $6,6 \times 10^9$ párů bazí.

Hypervariabilními oblastmi se nazývají některé segmenty DNA, které jsou vysoce polymorfní a jedinci se v nich navzájem často liší. Právě takové segmenty jsou vybírány jako markery vhodné pro identifikaci jedince.

2.3 Genomy a původ hlavních zájmových druhů

2.3.1 Původ kočky a její genom

Kočka domácí (*Felis silvestris catus* L.) patří do řádu Carnivora (šelmy), čeleď Felidae (kočkovití). Je domestikovanou formou kočky divoké (*Felis silvestris* Schreber) a je živočichem synantropním. O tom, jak staré je soužití lidí a koček, svědčí například kosterní pozůstatky kočky divoké, objevené v hrobě v starověkých ruinách na Kypru. Nález je datován do doby před 9500 lety. Kočka divoká není na Kypru původní, tudíž se předpokládá, že tam byla dovezena, aby pomáhala chránit sklady potravin před hlodavci (Clutton-Brock, 1999).

Nálezy kočičích mumií v egyptských hrobkách značí, že tehdejší lidé si koček velmi vážili, dokonce je pokládali za božstvo. Město Bubastis, které se nacházelo v Nílské deltě, bylo zasvěceno bohyni koček Bastet. Zde se kočky balzamovaly a ukládaly na zvláštní kočičí hřbitov (Falke, 1987).



Obr. 1: Bohyně Bastet, The British Museum

Díky lodní dopravě byly kočky po hlavních obchodních cestách rozšířeny do celého světa. V současné době žije jen USA přes 83 milionů registrovaných koček (Pet Food Institute, 2010). Podle výzkumu je téměř nemožné vejít do domu, kde přebývá kočka nebo pes, a neodnést si na oblečení několik jejich chlupů (D'Andrea, 1998). Vzhledem k tomu se kočičí chlupy dají často nalézt i na místě činu, a stávají se důležitým vodítkem při propojení místa trestného činu a pachatele.



Obr. 2: Kočičí mumie, Egypt (Musée de Louvre)

Genom kočky domácí obsahuje 18 párů autozomů a XY gonozomy. Některé druhy kočkovitých šelem, jako například ocelot, mají pouze 17 párů autozomů (Murphy, 2000).

Studium kočičího genomu probíhá zejména v posledních deseti letech. V posledních pěti letech vznikly i kočičí genetické mapy a kočičí genetické databáze, je tedy možná i individuální identifikace.

Plemena koček vznikla šlechtěním na základě vzhledového fenotypového projevu 10-30 genů. Historicky bylo zaznamenáno přibližně 120 plemen, některá však zanikla. V současné době je v USA podle TICA (TICA, 2010) registrováno 55 plemen, podle CFA (CFA, 2010) 40. Moderní plemena (např. sphynx) jsou stará přibližně sto let, a jsou šlechtěná uměle, kdežto historická plemena (např. egyptská mau, birman či kočka siamská), jejichž historie sahá stovky let do minulosti, byla vedle cíleného šlechtění ovlivněna i např. geografickou izolací oblasti. Na rozdíl od psů lze kočky různých plemen bez omezení křížit mezi sebou, což dává vznik novým plemenům. Moderní plemena však, oproti těm historickým, v současné době nelze identifikovat DNA analýzou (Menotti-Raymond, 2008).

2.3.2 Původ psa a jeho genom

Pes domácí (*Canis lupus familiaris* L.) se řadí mezi *Carnivora* (šelmy), čeleď *Canidae* (psovití). Vyvinul se z vlka (*Canis lupus* L.), přičemž k jejich křížení docházelo a dochází i nadále během jejich koexistence. Domestikace psa se datuje do doby před 14 000 lety (Vilà, 1999).

Pes domácí má mnoho desítek plemen, která vznikla šlechtěním na základě vlastnostního fenotypového projevu vzhledem ke svému účelu – například lovečtí psi, pastevečtí psi, tažní psi či hlídači. Dnes je známo přibližně 400 plemen. Plemena vzniklá na základě vzhledového fenotypového projevu se objevují teprve posledních 300 let. Mezi savci je naprosto unikátní, aby se mezi jedinci druhu vyskytovala taková variabilita, co se týče vzhledu, velikosti váhy a chování, jako je to u plemen psů. Přitom je možné, aby se křížili jedinci všech ras navzájem téměř bez výhrady (Wayne, 1999).

Psí genom obsahuje 38 párů autozomů a XY gonozomy. Zatímco X chromozom je velký, Y je nejmenším chromozómem karyotypu (Langford, 1996). Psí genom byl studován především v posledních deseti letech. V červnu roku 2004 byl první koncept osekvenovaného psího genomu (plemeno boxer) vložen do veřejné databáze při National Human Genome Research Institute (Broad Institute, 2004). Psí genom obsahuje přibližně 2,5 miliardy bp, což je přibližně stejně, jako obsahuje myší genom, ale méně než lidský genom (3,3 miliardy bp). Přibližně 31% genomových sekvencí psů bylo identifikováno jako repetitivní, což je méně než u lidí (46%). Srovnání lidských a psích genomových sekvencí by mohlo pomoci porozumět genetickým základům nemocí, které postihují jak lidi, tak psy. Dále je předmětem výzkumu příbuznost jednotlivých plemen a výběr genetických markerů, vhodných pro individuální identifikaci psů (což se nejvíce užívá při forenzní analýze) (Miller Coyle, 2007).

3. Identifikace

3.1 Zjištění druhové příslušnosti

Jak již bylo zmíněno ve druhé kapitole, zjištění druhové příslušnosti testovaného organismu je důležité pro ochranu ohrožených živočišných druhů, a dále např. v potravinářství, chovatelství či v archeologii.

S ochranou ohrožených druhů rostlin a živočichů přímo souvisí CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*, česky *Úmluva o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a rostlin*, známá též jako *Washingtonská úmluva*). Jedná se o nejdůležitější dohodu na mezinárodní úrovni, která chrání rostliny a živočichy. Jejím smyslem je především kontrola obchodu s ohroženými druhy živočichů a rostlin a s produkty, které se z nich vyrábí (např. potraviny, kožené výrobky, turistické suvenýry, medikamenty, ale i hudební nástroje). Úmluva byla schválena 1. července roku 1975 ve Washingtonu, D. C. a byla vydána čínsky, francouzsky, anglicky, rusky a španělsky. Dnes má CITES 175 členů, Česká republika se stala členem 1. 1. 1993 (CITES, 2010) ¹.

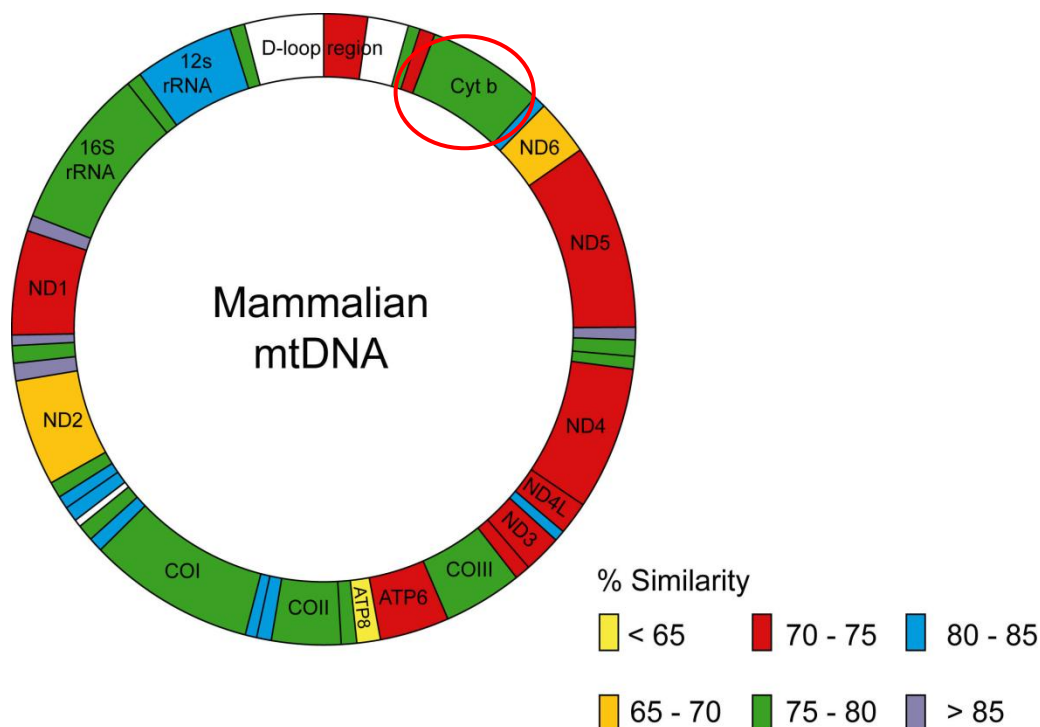
3.1.1 Principy

Pro úspěšnou identifikaci živočišného druhu je třeba použít takový test, který má dostatečnou mezidruhovou variaci (dokáže tedy rozlišit i blízkce příbuzné druhy), zároveň však má malou vnitrodruhovou variaci (poskytuje pozitivní výsledek u všech příslušníků druhu). Tyto podmínky splňuje především mitochondriální DNA (mtDNA) (Bellis, 2003). Mitochondrie je organela, kterou lze najít v buňce mimo jádro. Podle teorie endosymbiózy vznikla z bakterie, obsahuje tedy vlastní DNA genom. Oproti jaderné DNA je mtDNA díky své struktuře stabilnější, v jedné buňce se nachází větší množství mtDNA než nDNA, je možné pracovat i s poškozenými vzorky. MtDNA lze extrahovat i z chlupů bez kořínek, z kostí, z rohů, ale i z obsahu žaludku či tepelně upraveného masa (Zehner, 1998). Díky mtDNA lze určit druh, ale není možné takto rozlišit jedince ze stejné maternální linie, jako třeba matku a její potomky. Spermie sice obsahují mitochondrie, nikoli však ta část, která přechází do vajíčka. Z toho důvodu mají potomci pouze maternální mitochondrie.

¹ 15. konference CITES, která se konala v březnu roku 2010, byla spíše zklamáním. Proti pokusu o regulaci lovu tuňáků se postavilo Japonsko, a díky Indonésii a Číně se na seznam ohrožených druhů dostal ze čtyř navrhovaných druhů žraloka pouze jediný (UNEP, 2010). Přitom žralok je v Asii loven především kvůli tradiční polévce ze žraločích ploutví, kdy ulovenému žraloku jsou uříznuty ploutve, a je hozen zpátky do moře, kde uhynie (Stop Shark Finning, 2007).

Jedinou výjimkou je umělé oplodnění, kdy je do oocyty injektována celá spermie (Houshmand, 1997).

Nejčastější způsob identifikace druhu je založený na sekvenaci genu pro podjednotku cytochromu b v mtDNA (Zehner, 1997). Cytochrom b je transmembránový protein, je součástí dýchacího řetězce a kóduje 380 aminokyselin (De Co, 2005). Zatím bylo objeveno 32 milionů sekvencí (číslo je vysoké z toho důvodu, že jedinci se liší i v rámci druhu).



Obr. 3: Cytochrom b na savčí mitochondriální DNA.

3.1.2 Metody

Nejprve je třeba ze vzorku (např. krve, chlupu, kosti) izolovat mtDNA. Škála izolačních metod je nepřehledná, v současnosti se užívají především specializované kity cíleně připravené pro zpracování konkrétního typu biologického materiálu (Např IQ Hair and Tissue Kit firmy Promega, používaný k izolacím jak z lidského, tak zvířecího trichologického materiálu). Získaná DNA je poté amplifikována.

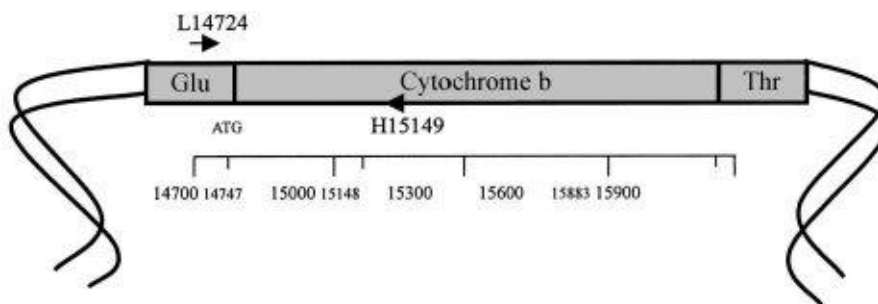
V osmdesátých letech Kary Mullis představil metodu, která znamenala revoluci v molekulární biologii. Jedná se o polymerázovou řetězovou reakci (PCR), která umožňuje amplifikaci nepatrného množství DNA. Roku 1993 obdržel Dr. Mullis za tento objev Nobelovu cenu za chemii (Nobel Prize, 1993).

Používá se v podstatě stejný princip, pomocí kterého je DNA kopírována v buňkách, ale na rozdíl od celých chromozomů je kopírován pouze krátký zvolený segment DNA. Díky tomu je možné zpracovat i minimální množství biologického materiálu, nalezeného na místě činu. (Hochmeister, 1998).

Proces PCR amplifikace se skládá ze tří základních kroků:

- 1) Denaturace dvoušroubovice za vysoké teploty (95°C)
- 2) Anelace (připojení) primerů, které určují, která specifická oblast DNA bude amplifikována (reakce probíhá při teplotě 50° - 65°C).
- 3) Syntéza nových vláken DNA. Syntéza probíhá při 72°C, a ukončuje proces amplifikace

Analýza cytochromu b probíhá tak, že se dva PCR primery designované do oblastí mezidruhově konzervativních nechají na tuto oblast nasednout, a vznikne produkt, který se následně osekvenován (Hsieh, 2001).



Obr. 4: Pozice primerů L14724 a H15149 na mitochondriální DNA. Amplifikací mezi L a H primerem vzniká přibližně 400bp produkt (Hsieh, 2001).

Sekvence cytochromu b jsou uloženy v databázích genetických dat, jako je mezinárodní GenBank, která zahrnuje data z evropské EMBL-EBI a japonské DNA DataBank. Tyto tři databáze si denně vyměňují informace, a k dubnu roku 2009 bylo v GenBank celkem zaznamenáno více než 100 milionů sekvencí (NCBI, 2009).

Metoda sekvenace genu pro podjednotku cytochromu b v mtDNA nalézá uplatnění také v taxonomii, kde pomáhá zařadit nově objevené živočichy do taxonomického systému (Castresana, 2001).

3.2 Identifikace živočišného jedince

3.2.1 Principy

Nejběžnějším principem identifikace je analýza STR (*Short Tandem Repeats*, česky *krátké tandemové repetice*), tedy repetitivních sekvencí s vysokým stupněm variability v rámci populace. Jsou přítomny jak v kódujících, tak nekódujících oblastech genomu (Hulák, 2006). STR systémy mají krátké jednotky opakování, obvykle 2-6 bp. Menší velikost (méně než 500 bp) je činí snadno amplifikovatelnými pomocí PCR. Po analýze je zapotřebí přibližně 1ng DNA, ale za určitých podmínek je možné pracovat i s řádově 20pg DNA. STR lokusy mohou být analyzovány v multiplexech, což znamená, že několik lokusů je amplifikováno současně v jediné PCR reakci. Multiplexové STR systémy zvyšují efektivitu a rychlost analýzy. Individuální identifikace jedince probíhá na principu porovnávání těchto vysoce polymorfních markerů. STR lokusy patří mezi nejvariabilnější oblasti genomu. STR polymorfismus je dán zejména rozdílem v počtu opakování základního motivu. Tento mnohotný alelismus se v průběhu evoluce vytvářel a vytváří několika mutačními mechanismy, z nichž těmi hlavními jsou „klouzání“ DNA polymerázy během replikace (tzv. replication slippage) a nerovnoměrný crossing-over ale také změny sekvencí v okolí STR lokusu (Ellegren, 2002). STR markery se amplifikují pomocí primerů komplementárních se sekvencemi sousedícími s STR lokusem.

Podmínkami pro použití STR lokusu pro forenzní analýzu jsou druhová specifita, nezávislost na dalších testovaných lokusech, charakteristický repetitivní motiv, vysoká heterozygotnost, mendelovskou dědičnost a absence nulových alel.

Donedávna byla DNA identifikace vzorků jiného než lidského původu limitována nedostatkem populačních databází příslušných živočišných druhů, jejichž existence je potřebná pro výpočet pravděpodobnosti shody (další možností je provádět výpočet v obecné a teoretické rovině). Díky objevení nových polymorfních STR markerů napříč eukaryotními genomy bylo možné vytvoření genetických map domácích živočichů, a tedy i jejich identifikace (Menotti-Raymond, 2005).

3.2.2 Metody

Nejčastější zvířecí stopou jsou deriváty kůže (zejména chlupy). V paprscích pera a stvolu chlupu je obsah jaderné DNA velmi malý, větší množství se jí nachází v bazálních částech těchto útvarů. Jako srovnávací vzorek se používá krevní vzorek, bukální stěr, nebo, například u hovězího dobytka, nasální vzorek.

Ze vzorku jsou nejprve izolována buněčná jádra pomocí centrifugace. K extrakci a čištění DNA se

užívá například guanidin isothiokyanát. Získaná DNA je následně amplifikována metodou PCR. Pro amplifikaci STR markeru je obvykle třeba 28-32 celých PCR cyklů (denaturace, anelace a syntéza). Fluorescenční značení vznikajících fragmentů je do nich vnášeno během PCR pomocí fluorescenčního barviva komplementárně vázaného vždy k jednomu z páru primerů. Poté, co je provedena PCR, se jednotlivé fragmenty DNA rozdělí podle délky kapilární gelovou elektroforézou. Fluorescenčně značené DNA fragmenty procházejí kapilárou před okénko laseru. Zde je pomocí laserového paprsku vybudena fluorescence, jejíž vlnová délka a intenzita je zaznamenána detektorem. Výsledkem takové analýzy je tedy tzv. elektroforetogram, který zobrazuje intenzitu fluorescence v jednotlivých spektrálních pásech v průběhu času. Výrazné zvýšení fluorescence, tzv. peak, odpovídá průchodu fragmentu určité délky (Gill, 2005).

Pro zjištění skutečné velikosti fragmentů DNA se používá DNA žebřík (*DNA ladder*), což je směs DNA fragmentů známé velikosti, která je porovnána s testovanými vzorky. Na závěr jsou výsledky vyhodnoceny počítačovým programem.

3.3 Nejčastěji testované živočišné druhy

Mezi nejčastěji testované živočišné druhy patří kočky, psi, koně, hovězí dobytek, ptáci, losi, jeleni (Blackett, 1992), medvědi, losi (Guglich, 1993), dále pak ovce, prasata a kozy. Podrobněji se zmíním o kočkách, psech, koních a hovězím dobytku.

3.3.1 Kočky

U kočkovitých šelem jsou chlupy nejběžnějším forenzně testovaným materiálem. Kočky mají ovšem ve zvyku čistit svoji i cizí srst jazykem, a může se tedy stát, že testovaný kočičí chlup bude znečištěn slinami jiné kočky (Menotti-Raymond, 2005).

Nejvíce DNA se nachází v kořincích chlupů, nejméně pak v chlupech starých, vylínalých či těch, které pocházejí z podsady. Pro maximalizaci informace pocházející z chlupů a ostatních materiálů se používá metoda PCR (Menotti-Raymond, 2005).

Identifikace jedince je možná posledních deset let díky existenci singl-lokusových sond, kočičích genetických databází a kočičích genetických map.

Jeden z prvních případů použití STR k identifikaci kočkovité šelmy se udál v Kalifornii. Časně z rána 4. prosince 1994 se žena šla sama projít do národního parku Cuyamacha Rancho (poblíž San Diega), kde byla napadena a zabita americkou pumou. Správci parku pumu zastřelili a vzorky její DNA byly podrobeny analýze. STR profily z DNA izolované z chlupů pumy nalezených na těle oběti

a z mrtvé pumy se shodovaly, jednalo se tedy o pumu, která útočila (Miller Coyle, 2007).

Dr. Menotti-Raymond z Nacional Cancer Institute's Laboratory of Genomic Diversity vytvořila v roce 2002 multiplex pro individuální identifikaci koček. Na trh měl být poté uveden kočičí kit MeowPlex (Menotti-Raymond, 2002), nikdy k tomu však nedošlo.

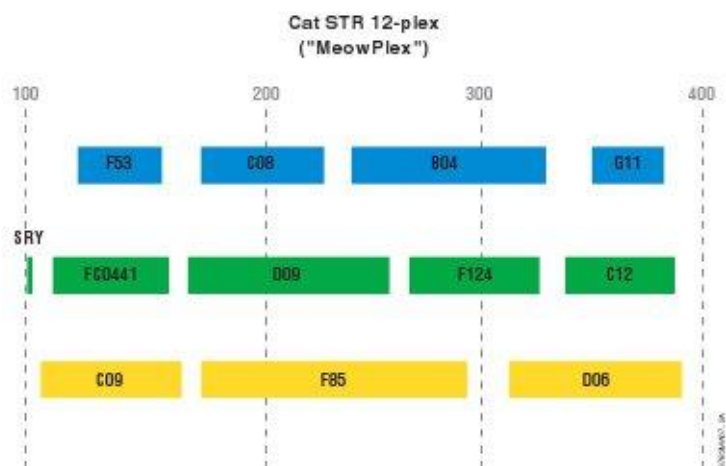
Multiplex se skládá z 11 kočičích STR markerů, které dodal National Cancer Institute. Součástí multiplexu je marker na identifikaci pohlaví, který tvoří primery specifické pro SRY gen na kočičím Y chromozomu.

V tabulce jsou zachyceny názvy lokusů, fluorescenční barviva, chromozomální lokalizace, heterozygotita, počet alel a repetitivní motiv.

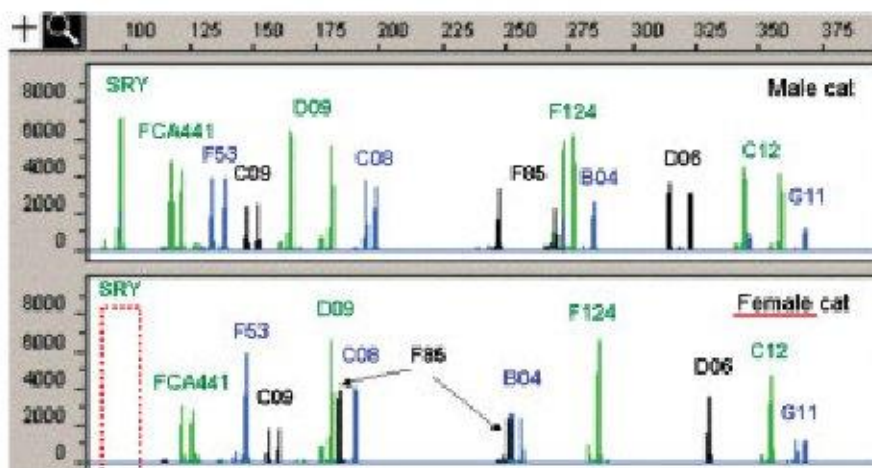
Locus Identifier	Dye Label	Chromosomal Location	Observed Heterozygosity (range across breeds)	Alleles Observed	Repeat Motif
F53	Blue	A1	0.53–0.93	9	Simple repeat [AAGA]
C08	Blue	B2	0.44–1.00	17	Compound repeat [ATAG][ATAC]
B04	Blue	A1	0.35–0.93	22	Compound repeat [AAGG][AAAG]
G11	Blue	B1	0.10–0.80	6	Simple repeat [ATCC]
FCA441	Green	D3	0.20–0.89	10	Simple repeat [ATAG]
D09	Green	B4	0.43–0.93	26	Compound repeat [ACAT][ATAG]
F124	Green	E1	0.51–0.93	20	Compound repeat [AGGA][AGAA]
C12	Green	F2	0.20–0.96	14	Complex repeat [AGAT][ACAT]
C09	Yellow	D4	0.00–0.94	15	Simple repeat [CTTT]
F85	Yellow	B1	0.66–0.98	33	Complex repeat [TTTC][TCTC]
D06	Yellow	C1	0.17–0.94	22	Simple repeat [TATC]
SRY	Green	Y	N/A	+/-	Gender ID

Tab. 1: Kočičí STR markery obsažené v multiplexu. Použity byly vzorky z 200 koček, představujících 29 různých plemen (Menotti-Raymond, 2002).

Velikost produktů po PCR amplifikaci multiplexu se pohybovala od 100bp do 400bp. Byly použity tři fluorescenční. Primery byly designovány tak, aby mezi každým lokusem stejné barvy vynesly zhruba 20bp, aby se zabránilo překrývání, až budou v budoucnu objeveny nové alely.



Obr. 5: Oblasti alel a použité barvy v kočičím STR multiplexu (Menotti-Raymond, 2002).



Obr. 6: PCR amplifikace MeowPlexu u samce a u samice (Menotti-Raymond, 2002).

STR lokusy vybrané pro kočky domácí se používají i v genetických studiích ohrožených kočkovitých šelem, jako je lev, jaguár, tygr, leopard, rys, gepard, ocelot, puma a kočka divoká (Miller Coyle, 2007).

3.3.2 Psi

K testování psů dochází velmi často z důvodů napadení člověka psem (De Munyck, 2002), nebo v případě škod způsobených psem (Schneider, 1999).

V USA se ročně dochází k více než milionu případů napadení člověka psem (některé zdroje uvádějí až 4,7 milionů případů). Kousnutí je chápáno jako poškození kůže, způsobené zuby zvířete.

Výjimečně může napadení psem končit smrtí člověka. Nejčastějšími oběťmi jsou děti do 4 let a staří lidé. Ve většině případů byli lidé napadeni svými vlastními psy (De Munnyck, 2002).

Počty případů napadení člověka psem v ČR pro období 2000-2009 se nacházejí v následující tabulce (Tab. 2).

Kousnutí nebo úder psem (dg. W54) - hlášené případy, hospitalizace a úmrtí v letech 2000 - 2009

Rok	Počet případů ve věku			Počet ¹⁾ hospitalizací	Počet úmrtí ²⁾
	0 - 14	15+	celkem		
2000	897	1 791	2 688	436	-
2001	763	1 644	2 407	363	-
2002	675	1 534	2 209	555	1
2003	568	1 358	1 926	458	3
2004	437	1 164	1 601	483	2
2005	457	1 234	1 691	433	1
2006	358	1 043	1 401	362	-
2007	335	1 011	1 346	379	2
2008	312	892	1 204	365	2
2009	283	817	1 100	265	-

Zdroje dat: Informační systém infekční nemoci (EPIDAT), SZÚ

¹⁾ Národní registr hospitalizovaných, ÚZIS

²⁾ Statistika příčin smrti, ČSÚ

Tab. 2: Statistiky napadení člověka psem v České republice (ÚZIS ČR, 2010 – údaje poskytnuty ÚZIS ČR na dotaz).

V případě, že dojde k pokousání člověka psem, bývají důležitým zdrojem informací sliny nalezené v ráně (Clayton, 1998).

Psí chlupy jsou rovněž často testovaným materiálem. Ovšem samotný chlup obsahuje velmi málo DNA, což může být problematické především v případě kriminálních vyšetřování. Na místě činu se dá zpravidla nalézt od 1 do 10 chlupů, což často na identifikaci nestačí. Optimální množství je mezi 10 až 50 chlupy (Pfeiffel, 2004).

Individuální identifikace psů pomocí DNA by v budoucnu mohla najít využití i v úklidu městských ulic a parků. V izraelském městě Petah Tikla (nedaleko Tel Avivu) byl zaveden půlroční zkušební program, v rámci kterého pomohly DNA testy psů bojovat proti psím exkrementům na chodnících. Majitelé psů byli požádáni, aby nechali svým psům odebrat bukální stěry, z kterých se vytvořila databáze. Tato databáze byla rovněž použita na výzkum dědičných onemocnění u psů, a na

identifikaci zatoulaných zvířat, kde by v budoucnu DNA testy mohly nahradit čipy. Poté co byla databáze sestavena, bylo díky DNA psa možné identifikovat majitele, který po svém psovi neuklízí a pokutovat ho. Naopak ti, kteří exkrementy odklízeli do speciálních košů, získávali poukázky na psí krmení a hračky. (Landau, 2008).

3.3.3 Koně

Koně mají pro člověka význam hned v několika oblastech. Jsou používáni pro práci (např. koně policejní, či tažní), zábavu, sport, lékařské účely (hipoterapie) a také jako potrava (Kelkena, 2009). Identifikace koně pomocí DNA se uplatňuje především v případě krádeže, a záměny koně za jiného. Záměny koní, ať úmyslné či z nedbalosti, se týkají především koňských dostihů. Totožnost koně se zjišťuje pomocí multiplexu, skládajícího se ze 17 lokusů².

Locus	Fluorescent dye	Chromosome location	Size range (nucleotides)
VHL20	6-FAM	30	83-102
HTG4	6-FAM	9	116-137
AHT4	6-FAM	24	140-166
HMS7	6-FAM	1	167-186
HTG6	VIC	15	74-103
AHT5	VIC	8	126-147
HMS6	VIC	4	154-170
ASB23	VIC	3	176-212
ASB2	VIC	15	237-268
HTG10	NED	21	83-105
HTG7	NED	4	114-126
HMS3	NED	9	146-170
HMS2	NED	10	215-236
ASB17	PET	2	104-116
LEX3	PET	X	137-160
HMS1	PET	15	166-178
CA425	PET	28	224-247

Tab 3: Názvy lokusů, chromozomální lokalizace, druhy barviva a velikost produktů po amplifikaci všech 17 markerů, použitých v multiplexu (17-Plex Horse Genotyping Kit) (Dimsoski, 2003).

Nový kit, určený pro identifikaci koní, (17-Plex Horse Genotyping Kit) se skládá z 12 původních lokusů (VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, HMS6, HTG7, HMS3, AHT5, ABS2, HTG10 a HMS2), doporučených *International Society for Animal Genetics*, a z 5 nových lokusů (ASB17, LEX3, HMS1, CA425 a ASB23). Kit je optimalizován na použití 0,2 – 10ng DNA templátu (Dimsoski, 2003). V roce 2009 vytvořil Van de Goor návrh nomenklatury alel jednak pro 17 STR lokusů, používaných k identifikaci koní (Van de Goor, 2010), ale i pro 16 STR lokusů, používaných pro identifikaci

² Pro úspěšnou identifikaci je třeba minimálně 10 lokusů (Miller Coyle, 2007).

hovězího dobytka (Van de Goor, 2009).

3.3.4 Hovězí dobytek

DNA analýza se úspěšně používá při vyšetřování krádeží či záměn hovězího dobytka. Pro identifikaci byl použit nejprve standardní set 11 STR markerů. Testování založené pouze na 11 markerech nevyhovovalo v případech potomků dvou vzdálenějších příbuzných. Bylo tedy dodáno dalších 11 markerů.

Nejvyšší šance úspěšnou identifikaci je v případě, že jsou k dispozici data jak od matky, tak od otce. Na druhou stranu je nutné si uvědomit, že na farmách se chová mnohem méně býků, než krav, tudíž se může stát, že jen několik málo býků bývá používáno k oplodnění většiny krav v dané oblasti (Miller Coyle, 2007).

V roce 2009 prezentoval van de Goor 16 STR lokusů (BM1818, BM1824, BM2113, CSRM60, CSSM66, ETH3, ETH10, ETH225, HAUT27, ILSTS006, INRA023, SPS115, TGLA53, TGLA122, TGLA126, a TGLA227) vhodných STR-analýzu hovězího dobytka. Tyto lokusy jsou doporučovány také International Society for Animal Genetics, a jsou vhodné pro úspěšnou forenzní DNA analýzu. Data pocházejí od 4,162 náhodně vybraných kusů dobytka, reprezentujících 20 různých plemen (van de Goor, 2009).

4. Okruhy užití forenzní DNA analýzy živočichů

4.1 Kriminallistika

Forenzní testování zvířecí DNA se užívá v případě, kdy zvíře napadne člověka, zvířecí materiál je stopou z místa trestného činu, zvíře způsobí nějakou nehodu, či škodu (Schneider, 1999).

V blízkosti lidí se nejvíce vyskytují psi a kočky, jejich stopy (zejména kožní deriváty, sliny a krev) tedy bývají často nalezeny na místě trestného činu. Dále lze běžně nalézt i stopy po hlodavcích a ptácích.

První případ, kdy byla forenzní DNA analýza zvířete použita při vyšetřování trestného činu, vešel do povědomí jako "Případ Snowball". Udál se v roce 1994, a vraha usvědčily chlupy z jeho kočky jménem Snowball, nalezené na místě činu (viz kpt. 5.1 Případ Snowball).

Další situace, ve které přichází na řadu forenzní DNA analýza, je napadení zvířete jiným zvířetem. Takový případ se udál v roce 2007 v Richmondu ve Virginii. Marilyn Christian našla svou kočku Cody mrtvou na zahradě, a "vrah" zanechal poblíž místa činu několik šedých chlupů. Majitelka kočky tedy nechala odebrat vzorky DNA psovi ze sousedství, a po porovnání se vzorky získanými z šedých chlupů, které provedla Veterinární genetická laboratoř při Kalifornské univerzitě, bylo zjištěno, že oba vzorky se shodují. Kočku tedy zabil pes sousedů (Gelineau, 2007).

Forenzní testování zvířecí DNA se užívá ve vyšetřování případů týrání zvířat, krádeží, identifikace ztracených zvířat nebo zvířat, jejichž identita je nejistá.

4.2 Ochrana životního prostředí

V ochraně životního prostředí je identifikace druhu a jedince velmi důležitá. Forenzní DNA analýza se uplatňuje v případech, kdy dochází k poškozování životního prostředí, například k lovu vzácných savců či k ilegálnímu obchodu s ohroženými druhy.

V případě nalezení produktu, který by mohl pocházet z ohroženého druhu, je úkolem forenzní laboratoře identifikace druhu. Dále pak individuální identifikace, kdy je třeba prokázat spojení produktu s konkrétním organismem.

Například na Taiwanu byla identifikace, a tedy i ochrana ohrožených živočišných druhů často problematická. Původní způsob identifikace se zakládal na morfologii, nebo případně na elektroforéze proteinů izolovaných z produktů (masa, rohů). Bohužel proteiny nejsou ve všech buňkách stejné, liší se podle toho, v jaké tkáni se nacházejí. Dalším problémem byla degradace proteinů, ke které docházelo příliš brzy po smrti zvířete. Identifikace pomocí proteinů tedy nebyla příliš úspěšná. Když začala DNA Laboratoř, spadající pod Ministry of Justice Investigation Bureau

(MJIB), provádět DNA analýzy volně žijících živočichů, veškeré obtíže zmíněné u proteinů byly vyřešeny. Identickou DNA lze získat z kostí, svalů, krve či srsti, není nutná tak vysoká kvalita vzorku a DNA nedegraduje tak rychle jako proteiny. MJIB vyvinula způsob identifikace druhu založený na sekvenaci mtDNA, konkrétně genu pro podjednotku cytochromu b (Hsieh, 2001). V roce 1998 byla metoda po dvou letech výzkumů uvedena do praxe. Paradoxně se ukázalo, že produkty, které mají údajně pocházet z ohrožených živočichů, jsou v 90 % případů podvrhy. Například rozemleté kraví a prasečí kosti se prodávají jako tygří kosti či roh z nosorožce, a za žlučník kobry je vydáván žlučník běžného hada, nebo dokonce kuřete či kachny (Miller Coyle, 2007).

4.3 Chovatelství

Lidé, kteří se živí chovem zvířat, potřebují spolehlivý způsob identifikace druhu, jedince či pohlaví, stejně jako ti, kteří zvířata kupují. Například pokud chovatel dobytka kupuje inseminační dávku od plemenného býka, mohlo by dojít k její podvodné záměně za méně kvalitní. DNA analýzou se potom dá ověřit, zda dávka pochází skutečně od býka, za kterého chovatel zaplatil (Van Eenennaam, 2007). Inseminační dávky se využívají například u skotu, koní, prasat a psů.

Kromě původu inseminační dávky se ověřuje také původ potomků. Ten lze zjistit testem rodičovství (Zajc, 1994). Testy provádějí často soukromé laboratoře. Po ověření původu vystaví majiteli certifikát původu, což i zlepšuje podmínky pro prodej zvířete, či jeho pozdější využití k chovu. U některých druhů ptáků bývá obtížné rozeznat pohlaví, proto se k určování užívá DNA testu (Griffiths, 2000).

V USA je oblíbená analýza křížence. Podobné testy probíhají u psů a koček, u koček však v menší míře. Analyzovat psí křížence nechávají majitelé především proto, aby lépe poznali svého psa, a také proto, aby měli možnost předcházet zdravotním problémům, které se typicky váží na určitá plemena, či je mohli alespoň účinněji léčit. Nevýhodou je, že v databázi nemusejí být obsažena úplně všechna plemena, a tudíž touto cestou nelze s jistotou určit, zda je pes čistokrevný. Vzhledem k tomu, že se tyto testy užívají v hojné míře právě v USA, jejich databáze většinou zahrnují jen plemena typická pro tuto oblast.

Testování probíhá tak, že si zákazník objedná testovací kit, sám provede psovi bukalní stěr, a odešle na zpáteční adresu. Poté je vyhotovena DNA analýza. Způsob prezentování výsledků testu zákazníkovi se u různých firem liší.

Výsledek může vypadat například jako odstupňovaný seznam (1-5), sestavený podle shody DNA vzorku křížence a databáze čistokrevných plemen.

Level 1: Plemeno představuje > 75% DNA psa

Level 2 Plemeno představuje 37-74% DNA psa

Level 3: Plemeno představuje 20-36% DNA psa

Level 4: Plemeno představuje 10-19% DNA psa

Level 5: Plemeno představuje <10% DNA psa.

V praxi to potom vypadá následovně:

Level: 3 Afghan Hound

Level: 3 Labrador Retriever

Level: 4 Boxer

Level: 4 Poodle

Level: 5 Basenji

Level: 5 Greyhound



Obr. 7: Na obrázku se vpravo nachází testovaný kříženec, vlevo jsou výsledky jeho DNA analýzy (Happy Dog DNA, 2010).

4.4 Potravinářství

DNA analýzou se v potravinářství ověřuje, zda daný živočišný produkt nebyl úmyslně zaměněn za jiný, levnější. Dva studenti newyorské Trinity High School ve spolupráci s Rockefellerovou Univerzitou provedli v rámci školního projektu DNA analýzu potravin, se kterými se běžně setkávají. Výsledek byl překvapivý, z 66 testovaných potravin jich 11 pocházelo z jiných živočišných zdrojů, než jaké byly psány na obalu. Například robalo nilský byl prodáván jako žralok, ovčí mléko bylo zaměněno za kraví a kaviár nepocházel z jesetera, ale z veslonosa amerického (New York News, 2010).

4.5 Archeologie

Zvláštním případem, kdy se provádí DNA analýza živočichů, je zkoumání původu starověkých manuskriptů. Důvodem tohoto mezioborového propojení je skutečnost, že starověké manuskripty

bývají psány na pergamenu (nevydělané hlazené zvířecí kůži), ze kterého lze získat vzorky DNA. Tento způsob určování stáří manuskriptu je teprve v začátcích, ale slibuje větší přesnost, než určování stáří podle dialektu či rukopisu. Typický manuskript obsahuje kůže z více než stovky zvířat. Několik málo manuskriptů se známým původem tak poskytne dostatek genetických dat a umožní vybudování databáze. Na základě příbuzenských vztahů mezi zvířaty, jejichž kůže sloužily za zdroj pergamenu, lze určovat původ dosud sporných manuskriptů. Další výhodou databáze je podrobné zmapování tras, po kterých se obchodovalo s pergamenem a manuskripty (Poulakakis, 2007).

Zooarcheologie je mezioborová disciplína, zkoumající všechny zvířecí pozůstatky, nalezené na archeologických nalezištích v nějaké souvislosti s pozůstatky lidskými (např. zvířecí mumie). Alternativně bývá používán i název "bioarcheologie", který je ovšem někdy chápán jako obor zkoumající veškeré archeologické nálezy živočišného původu, tedy i lidské (Reitz, 2010). Předmětem zkoumání jsou nejčastěji kosterní nálezy, ze kterých se analýzou DNA určuje živočišný druh (Newman, 2002).

4.6 Botanika

Krátce zmíním i forenzní botaniku, třebaže s tématem přímo nesouvisí. DNA analýza je forenzními botaniky používána poměrně často, protože rostlinné mikrostopy neobsahují dost morfologických a histologických informací na to, aby bylo možné určit rod nebo odrůdu rostliny. DNA analýza rostlin je tedy důležitým nástrojem pro potenciální spojení jedince a místa činu, stejně jako např. zvířecí chlupy (Coyle, 2004). Prvním kriminálním případem, kdy byla použita DNA analýza rostlin, byla vražda, ke které došlo v roce 1992 v Arizoně. Tělo mrtvé ženy bylo nalezeno v Arizonské poušti pod stromem „Palo Verde“ -*Parkinsonia florida* (Benth. ex Gray) S. Wats. (syn. *Cercidium floridum*, *Cercidium torreyanum* (S. Watson) Sarg.). V autě podezřelé osoby pak bylo zjištěno několik tobolek Palo Verde a DNA analýza prokázala jejich shodu, což bylo důkazem spojujícím podezřelého s místem činu (Vaněk, 2002).

5. Kazuistika – slavné případy

5.1 Případ Snowball

Roku 1994 našla policie na Ostrově prince Edwarda v Kanadě tělo zavražděné Shirley Duguay. Podezření padlo na jejího bývalého manžela, Douglase Beamishe, scházely však důkazy. Nedaleko místa činu byla objevena bunda, na které se nacházela krev oběti, a několik chlupů, které byly mikroskopickou analýzou identifikovány jako kočičí. Vyšetřovatelé zjistili, že Beamish vlastní bílou kočku jménem Snowball, ale mikroskopická analýza nestačila na to, aby prokázali, že chlupy nalezené na bundě patří této konkrétní kočce.

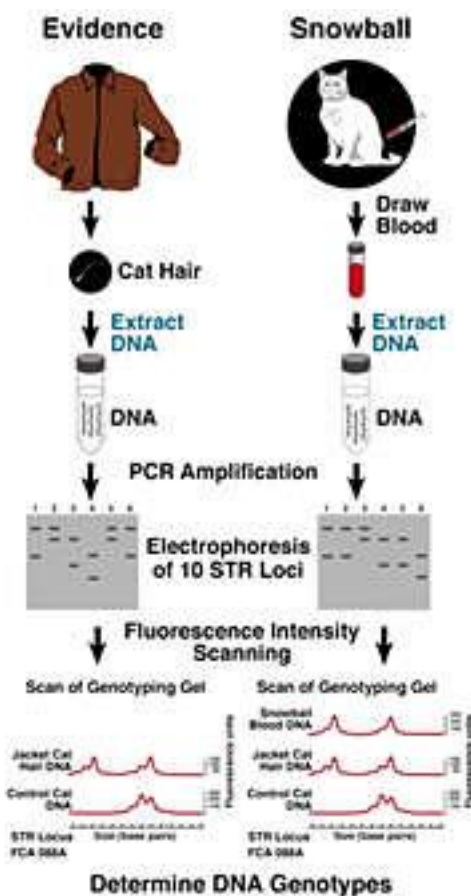


Obr 8: Kočka Snowball (Menotti-Raymond, 2003)

Vzhledem k tomu, že forenzní DNA analýza živočichů se v té době neprováděla (i když nějaké testy probíhaly), požádali policisté o pomoc Animal Genetics Group at the Laboratory of Genomic Diversity (LGD) in Frederick, Maryland. Po porovnání DNA z chlupů nalezených na bundě a DNA ze vzorku odebraného kočce Snowball se ukázalo, že oba vzorky se shodují. Stále tu byl jeden problém – Ostrov prince Edwarda je poměrně geograficky izolovaný, a dalo se tedy předpokládat, že zdejší kočky si budou blízce příbuzné. Pokud by tomu tak bylo, pak by shoda obou vzorků byla bezvýznamná. Policisté tedy odchytili dvacet náhodně vybraných koček z celého ostrova, odebrali jim vzorky krve, a ty nechali podrobit STR-analýze. Ukázalo se, že vzorky vybraných koček měli vysoký stupeň variability, a tedy, že shoda mezi Snowball a chlupy nalezenými na bundě nebyla

náhodná.

Díky práci genetiků byl Beamish obviněn z vraždy druhého stupně, a odsouzen k 18 letům vězení. O Snowball se postarali jeho rodiče. Tento případ také otevřel cestu pro DNA analýzu živočichů ve forenzních vědách. (Kolata, 1997).



Obr. 9: Grafické schéma, určené pro soudce zabývajícího se případem Snowball (Menotti-Raymond, 2003).

Na druhé straně doktor D. P. Lyle, lékař a spisovatel, upozorňuje na možnosti, podle kterých se zvířecí chlupy mohou dostat na místo činu velmi nečekanými cestami. Na svém blogu (The Writer's Forensics Blog) uvádí několik možností, jak by k tomu mohlo dojít. Například pokud by se podezřelý scházel se sestrou oběti, případně jeho známý by kočku pohladil na návštěvě a poté vyrazil s obětí na schůzku. Vlastník kočky mohl pracovat v myčce aut, a čistit oběti auto. Možností je tedy více, jak by se snadno přehlédnutelné zvířecí chlupy mohly dostat na místo činu (Lyle, 2009).

5.2 Vražda Seya Ogunyemiho

Případ se odehrál v jižním Londýně v dubnu roku 2009. Šestnáctiletého Seya Ogunyemiho a jeho kamaráda přepadla v parku skupina mladíků, a když se jim Ogunyemi pokusil utéci, poštval na něj Chrisdian Johnson svého stadfordširského bulteriéra, a poté oběť ubodal. Kamarád oběti přežil s devíti bodnými ranami.

Policejní experti určili s pravděpodobností jedna ku miliardě, že DNA z krve a slin Johnsonova psa je shodná se vzorky z těla oběti. Christidian Johnson byl odsouzen na doživotí. Je to první případ, kdy byl v Británii usvědčen vrah podle DNA psa (BBC News, 2010).

6. Závěr

Během doby, kdy jsem toto téma zpracovávala, jsem zaznamenávala další novinky, například vražda Seya Ogunyemiho, která se objevila v médiích měsíc před dokončením práce. Tudiž je více než pravděpodobné, že za rok by práce vypadala o něco jinak, obohacena o další případy a objevy, týkající se forenzní DNA analýzy živočichů. Snažila jsem se držet co možná nejaktuálnějších zdrojů, od vědeckých článků a knih po novinové články a internet.

Forenzní DNA analýza živočichů má mimořádně široké užití, které je někdy až překvapivé – např. v případě zkoumání stáří středověkým manuskriptů, či v úklidu městských ulic. V budoucnu by DNA testy mohly v identifikaci zvířat nahradit v čipy a tetování, které mohou být bolestivé a ne vždy spolehlivé (tetování je nutné časem po letech obnovovat, a čip může zloděj za určitých okolností odstranit). Klíčem k využití potenciálu forenzní DNA analýzy živočichů je dle mého názoru vytvoření rozsáhlých databází (které by vznikly mimo jiné tím, že majitel by měl povinnost nechat své zvíře testovat), a v budoucnu zrychlení a zlevnění testů.

Velký potenciál forenzní molekulárně genetické analýzy zvířat spočívá v jejím celkovém přínosu pro výzkum genetické analýzy. Na rozdíl od člověka, u zvířat je třeba rozeznávat plemena, někdy i blízkce příbuzná. Také DNA je extrahována z méně obvyklého materiálu (např. masné produkty, lovecké trofeje), než u člověka. Tyto poznatky lze následně uplatňovat i v genetické analýze člověka.

Je třeba mít v patrnosti, že navzdory všemu pokroku DNA analýzu a vyšetřování provádějí pouze lidé, a ti mohou chybovat. Ať už chyba nastane při odběru vzorků, či při vyhodnocení jejich nálezu na místě trestného činu, může mít fatální následky. Zvláště zvířecí chlupy se mohou na místo trestného činu dostat různými cestami, jak na svém blogu zmiňuje D. P. Lyle.

7. Použitá literatura:

Bellis C, et al. 2003. A molecular genetic approach for forensic animal species identification. *Forensic Science International* 134: 99-108.

Blackett R, Keim P. 1992. Big game species identification by deoxyribonucleic acid (DNA) probes. *J Forensic Sci* 37(2): 590-596

Bruder C. 2008. Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles. *The American Journal of Human Genetics* 82: 763-771.

Butler DM. 2005. *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Oxford: Academic Press.

Castresana J. 2001. Cytochrome b phylogeny and the taxonomy of great apes and mammals. *Molecular Biology and Evolution* 18: 465-471.

Clayton T, et al. 1998. Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling. *Forensic Science International* 91: 55-70.

Clutton-Brock J. 1999. *A natural history of domesticated mammals*. Cambridge: Cambridge University Press.

Coyle HM. 2004. *Forensic botany: principles and applications to criminal casework*. New York: CRC Press.

Coyle HM. 2007. *Nonhuman dna typing: theory and casework applications*. New York: CRC Press.

Cronin M, et al. 1991. Mitochondrial DNA in wildlife forensic science: species identification of tissues. *Wildlife Society Bulletin*. 19: 94-105.

D'Andrea F, Fridez F, Coquoz R. 1998. Preliminary experiments on the transfer of animal hair during simulated criminal behavior. *Journal of Forensic Sciences* 43: 1257-1258.

De Coo I. 2005. *Genetic defects in patients with mitochondrial encephalomyopathies*. Rotterdam: I.F.M.

De Munnynck K, Van De Voorde V. 2002. Forensic approach of fatal dog attacks: a case report and literature review. *International Journal of Legal Medicine* 116: 295-300.

Dimoski P. 2003. Development of a 17-plex microsatellite polymerase chain reaction kit for genotyping horses. *Croatian Medical Journal* 44: 332-335.

- Ellegren H. 2002. Microsatellite evolution: a battle between replication slippage and point mutation. *Trends in Genetics* 18: 70.
- Falke T, et al. 1987. Computed tomography of an ancient egyptian cat. *Journal of Computer Assisted Tomography* 11: 563-749.
- Gill P, et al. 2005. Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic casework - a strategy for the future. *Electrophoresis* 16: 1543 - 1552.
- Goodwin D. 2007. *An Introduction to Forensic Genetics*. New York: Wiley.
- Griffiths P. 2000. Sex identification in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 9: 14-26.
- Guglich EA, Wilson PJ, White BN. 1993. Application of DNA fingerprinting to enforcement of hunting regulations in Ontario. *J Forensic Sci* 38(1):48-59.
- Halverson J, Basten C. 2005. A PCR multiplex and database for forensic DNA identification of dogs. *J Forensic Sci* 50: 352-363.
- Hochmeister M. 1998. PCR analysis of DNA from fresh and decomposed bodies and skeletal remains in medicolegal death investigations. *Methods in Molecular Biology* 98: 19-26.
- Houshmand M, et al. 1997. Is paternal mitochondrial DNA transferred to the offspring following intracytoplasmic sperm injection? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 14: 223-227.
- Hsieh H, et al. 2001. Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. *Forensic Sci Int* 122: 7-18.
- Hulák M, et al. 2006. Využití DNA metod a molekulárních markerů v genetice ryb. *Bulletin VÚRH Vodňany* 42: 69-73.
- Inman K, Rudin N. 2001. *An introduction to forensic DNA analysis*. New York: CRC Press.
- Jeffreys A, Gill P, Werrett D. 1985. Forensic application of DNA „fingerprints“. *Nature* 318: 577 - 579 .
- Kelekna P. 2007. *The horse in human history*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Langford C, et al. 1996. Chromosome-specific paints from a high-resolution flow karyotype of the dog. *Chromosome Research* 4: 115-123.
- Menotti-Raymond M, et al. 2005. STR forensic typing system for genetic individualization of domestic cat (*Felis catus*) samples. *J Forensic Sci* 50: 1061-1070.

- Menotti-Raymond M, et al. 2008. Patterns of molecular genetic variation among cat breeds. *Genomics* 91: 1-11.
- Menotti-Raymond M, et al. 2002. The MeowPlex: a new DNA test using tetranucleotide STR markers for the domestic cat. *Profiles in DNA* 5: 7-10.
- Murphy W, et al. 2000. A radiation hybrid map of the cat genome: implications for comparative mapping. *Genome Res* 10: 691–702.
- Newman M, et al. 2002. Identification of archaeological animal bone by PCR/DNA analysis. *Journal of Archaeological Science* 29: 77-84.
- Parson W, et al. 2000. Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine* 114: 23-28.
- Pfeiffel I, et al. 2004. Forensic DNA typing of dog hair: DNA extraction and PCR amplification. *Forensic Science International* 141: 149-151.
- Reitz E, Wing, E. 1999. *Zooarchaeology (Cambridge manuals in archaeology)*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Schneider P, Seo Y, Rittner C. 1999. Forensic mtDNA hair analysis excludes a dog from having caused a traffic accident. *International Journal of Legal Medicine* 112: 315-316.
- Stiglec R, Ezaz T, Graves J. 2007. A new look at the evolution of avian sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 117: 103-109.
- Poulakakis N, et al. 2007. Ancient DNA and the genetic signature of ancient Greek manuscripts. *Journal of Archaeological Science* 34: 675-680.
- Van De Goor L, Koskinen M, Van Haeringen W. 2009. Population studies of 16 bovine STR loci for forensic purposes. *International Journal of Legal Medicine* 123: 186-198.
- Van De Goor L, Panneman H, Van Haeringen W. 2009. A proposal for standardization in forensic bovine DNA typing: allele nomenclature of 16 cattle-specific short tandem repeat loci. *Animal Genetics* 40(5): 630-636
- Van De Goor L, Panneman H, Van Haeringen W. 2010. A proposal for standardization in forensic bovine DNA typing: allele nomenclature of 17 equine-specific short tandem repeat loci. *Animal Genetics* 41(2): 122-127.
- Vaněk D. *Forenzní analýza DNA*. Praha, 2002. 57 s. Dizertační práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy.

Van Eenennaam A, et al. 2007. DNA-based paternity analysis and genetic evaluation in a large, commercial cattle ranch setting. *J Anim Sci* 85: 3149-3169.

Wayne R, Ostrander E. 1999. Origin, genetic diversity, and genome structure of the domestic dog. *BioEssays*: 247-257.

Vilà C, Maldonado J, Wayne R. 1999. Phylogenetic relationships, evolution, and genetic diversity of the domestic dog. *The Journal of Heredity* 90: 71-77.

Zajc I, et al. 1994. A new method of paternity testing for dogs, based on microsatellite sequences. *The Veterinary Record* 135: 545-547.

Zehner R, Zimmermann S, Mebs D. 1998. RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. *Int J Legal Med* 111: 323-327.

Internetové zdroje:

BBC News [online]. 19 Mar 2010 [cit. 2010-04-16]. London dog attack murderer jailed for life. Dostupné z WWW: <http://news.bbc.co.uk/2/hi/uk_news/england/london/8575766.stm>.

Broad Institute [online]. 2004 [cit. 2010-04-19]. Dog Genome Project. Dostupné z WWW: <<http://www.broadinstitute.org/mammals/dog>>.

CFA [online]. 2010 [cit. 2010-04-19]. CFA Breeds. Dostupné z WWW: <<http://www.cfa.org/breeds.html>>.

CITES [online]. 2010 [cit. 2010-04-19]. What is CITES?. Dostupné z WWW: <<http://www.cites.org/eng/disc/what.shtml>>.

Nobel Prize: The Official Web Site of the Nobel Prize [online]. 1993 [cit. 2010-07-15]. Kary B. Mullis - Autobiography. Dostupné z WWW: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis.html>.

UNEP: environment for development [online]. 2010 [cit. 2010-07-15]. CITES conference ends without new sharks in its net. Dostupné z WWW: <<http://www.unep.org/Documents.Multilingual/Default.asp?DocumentID=617&ArticleID=6515&=en>>

Gelineau K [online]. 29 May 2007 [cit. 2010-04-15]. Use of animal forensics on the rise. Dostupné z WWW: <http://www.usatoday.com/tech/news/2007-05-29-animal-forensics_N.htm>.

Gene Codes [online]. 2009 [cit. 2010-04-27]. Sequencher 4.10.1. Dostupné z WWW: <<http://www.genecodes.com/>>.

Happy Dog DNA [online]. 29 March 2010 [cit. 2010-04-15]. Happy Dog DNA blog. Dostupné z WWW: <<http://www.happydogdna.com/>>.

Kolata G [online] 24 Apr 1997 [cit. 2010-04-16]. Cat Hair Finds Way Into Courtroom in Canadian Murder Trial. New York Times. Dostupný z WWW: <<http://www.nytimes.com/1997/04/24/world/cat-hair-finds-way-into-courtroom-in-canadian-murder-trial.html?pagewanted=1>>.

Landau A. [online] 16 Sep 2008 [cit. 2010-04-21]. City uses DNA to fight dog poop. Reuters UK. Dostupné z WWW: <<http://uk.reuters.com/article/idUKLG37942520080916>>.

Lyle D. The Writer's Forensics Blog [online]. 14 Jun 2009 [cit. 2010-04-16]. Animal Hair, DNA, and Snowball the Cat. Dostupné z WWW: <<http://writersforensicsblog.wordpress.com/2009/06/14/animal-hair-dna-and-snowball-the-cat/>>.

National Center For Biotechnology Information [online]. 31 Mar 2004 [cit. 2010-04-16]. A Basic Introduction to the Science Underlying NCBI Resources. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/genetics_genome.html#genome>.

National Human Genome Research Institute [online]. 2003 [cit. 2010-04-22]. The Human Genome Project Completion: Frequently Asked Questions. Dostupné z WWW: <<http://www.genome.gov/11006943>>.

NCBI [online]. 2009 [cit. 2010-04-27]. GenBank Overview. Dostupné z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>.

New York News [online]. 24 Feb 2010 [cit. 2010-04-15]. Students Uncover Mislabeled Foods Through DNA Testing. Dostupné z WWW: <http://www.myfoxny.com/dpp/your_money/consumer/students-uncover-mislabeled-foods-through-dna-testing-100223>

Pet Food Institute [online]. 2010 [cit. 2010-04-16]. Pet Dog and Cat Population. Dostupné z WWW: <<http://www.petfoodinstitute.org/Index.cfm?Page=USCatandDogPopulation>>.

Stop Shark Finning [online]. 2007 [cit. 2010-04-19]. What is shark finning?. Dostupné z WWW:
<<http://www.stopsharkfinning.net/shark-finning.htm>>.

TICA [online]. 2010 [cit. 2010-04-19]. TICA Breeds. Dostupné z WWW:
<<http://tica.org/public/breeds.php>>.