

Dna afslører Ruslands sidste zar

Udviklingen af moderne metoder til at identificere personer ved hjælp af dna-analyser er i dag så fremskreden, at de også kan bruges til at identificere historiske personer. Et lærerigt eksempel er identifikationen af Ruslands sidste zar.

Af Peter K. A. Jensen

■ Det er i dag principielt og også praktisk muligt at opnå nøjagtig og sikker identifikation af humant arkæologisk og historisk materiale ved analyse af dna. Analyserne udføres på minimale rester af dna bevaret i fossiler eller i organisk arkæologisk materiale (kaldet "fossilt dna", "ancient dna" eller blot adna). Til nogle formål er det hensigtsmæssigt at supplere med analyse af dna fra nulevende personer.

Den genetiske identifikation af skeletterne af den sidste russiske zar, Nikolaj II, zarinaen, Alexandra og deres fem børn er et fascinerende og lærerigt eksempel på anvendelsen af dna-analyse inden for den historiske retsmedicin.

Zaren og zarinaen blev sammen med deres fem børn, Olga, Tatjana, Maria, Anastasia og Aleksej myrdet af bolsjevikkerne den 16. juli 1918. Herved sluttede Romanovslægtens næsten 300-årige herredømme over det russiske rige. Forud var zarfamilien sammen med deres læge og



Den sidste russiske Zar, Nicolaj II. Malet af Earnest Lipgart.

tre af staben blevet holdt fanget i Ipatiev-huset i Jekaterinburg (Sverdlovsk i Sovjettiden). Først i 1991 blev graven med de formodede rester af zarfamilien på

Boris Jeltsins ordre undersøgt nærmere. Graven var dog allerede i 1979 blevet lokaliseret til et skovområde ca. 30 km uden for Jekaterinburg. Graven viste

sig at indeholde i alt ni skeletter, fem fra kvinder og fire fra mænd. En foreløbig retsmedicinsk undersøgelse gjorde det sandsynligt, at fem af skeletterne vittterligt hidrørte fra zarfamilien, mens de øvrige fire tilhørte familiens læge og tre af det øvrige personale. To af børnene manglede således, og sandsynligvis drejede det sig om Aleksej og Anastasia.

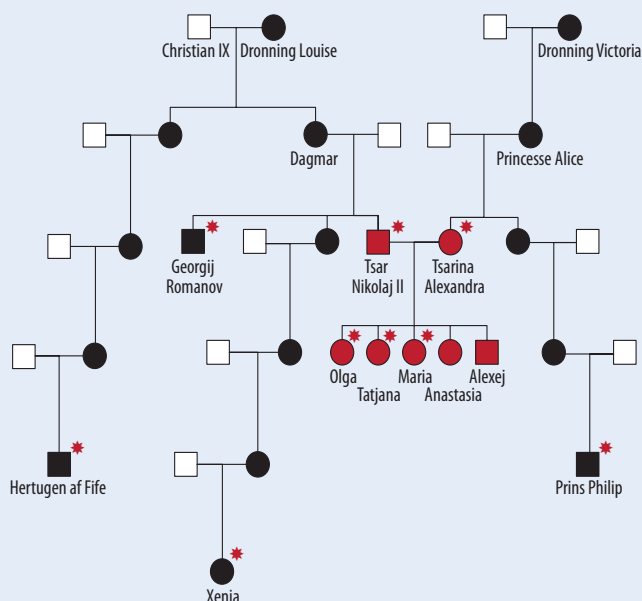
De første dna-undersøgelser

I 1994 blev det besluttet at søge at få sagen endelig afklaret ved hjælp af dna-undersøgelser. Analyserne blev udført på mitokondrie-dna, som nedarves udelukkende fra moder til børn. Man koncentrerede sig om analyse af de dele af mitokondrie-dna, der vides at være sæde for særlig hyppige mutationer. Foruden dna fra skeletterne var det nødvendigt at få dna fra levende slægtninge af samme kvindelinje til de afdøde. Zarinaen var barnebarn af den engelske dronning Victoria og



Romanov-familien 1914: (Fra venstre mod højre) Olga, Maria, Nikolaj, Alexandra, Anastasia, Alexej og Tatjana.

Stamtræ



Stamtræ over den russiske zar-familie (Romanov). "Kernefamilien" er vist med røde symboler. Relevante slægtninge er vist med sorte symboler. De med * markerede personer indgik i undersøgelsen. Det ses, at hertugen af Fife og Xenia er beslægtet med zaren i ubrudte kvindelinjer, og tilsvarende er prins Philip beslægtet gennem en ubrudt kvindelinje med zarinaen. Cirkler symboliserer kvinder, firkanter mænd.

være til stede i praktisk taget alle sådanne dna-molekyler i alle celler (en tilstand, der benævnes homoplasm). Men indtil da vil der altså optræde to populationer af mitokondrie-dna hos samme person, hvilket betegnes heteroplasm.

De øvrige resultater var imidlertid utvetydige for zarens vedkommende (se boks næste side).

På grund af den usikkerhed, som den påviste heteroplasm hos zaren afstedkom, blev den officielle rapport om undersøgelsen udsat, og det blev besluttet at inddrage skelettet af zarens bror, Georgij Romanov, som var død af tuberkulose i 1899, i analysen. Analyse af hans mitokondrie-dna gav fuldstændig samme resultat som zarens, inklusive heteroplasmien i position 16169. Konklusionen blev derfor, at man havde identificeret den rigtige zar, og at der i zarens mors kvindelinje måtte have optrådt heteroplasm i nogle generationer.

Overlevede Anastasia?

Der har været et særligt problem med identifikationen af Anastasia, hvis skelet aldrig blev fundet i graven. Adskillige personer har i tidens løb påstået at være Anastasia, men ingen har været så vedholdende som Anna Anderson, som livet igennem vedblev at hævde, at hun var den fortabte prinsesse. Anna Anderson var bosat i USA, og hun fremkom første gang med sin påstand i 1920, og da hun døde i 1984 var der stadig usikkerhed om hendes identitet. Anna Anderson var blevet kremeret, hvorfor det ikke var muligt at udvinde dna fra ligresterne. Men der fandtes en udvej: I 1970 var hun blevet opereret på et hospital i Charlottesville, Virginia. Væv, der var blevet fjernet i forbindelse med operationen, fandtes fortsat i sygehusets patologiske laboratorium efter 24 år. Det var derfor muligt at udføre en dna-profilanalyse på Anna Anderson i 1994. Resultatet var krystallklart: Anna Anderson var hverken beslægtet med zaren eller zarinaen.

Resultaterne var utvetydige for zarinaens og de tre døtres vedkommende, men for zarens vedkommende var der den komplikation, at han på en bestemt position i mitokondrie-dna'et (position 16169) havde to forskellige dna-sekvenser, hvor 30 % havde basen T og 70 % havde C. Zaren havde med andre ord to forskellige populationer af mitokondrie-dna svarende til position 16169. Når en ny mutation opstår, vil den i starten kun være til stede i ét mitokondrie-dna-molekyle i én celle, men i løbet af nogle få generationer vil den i reglen

En ny grav og nye dna-undersøgelser

I juli 2007 blev der fundet en ny grav ved Jekaterinburg med brændte knogler fra to individer; knoglerne var slemt medtaget af ild og svovlsyre. Da der var mistanke om, at den nye grav kunne rumme resterne af Aleksej og Anastasia, blev der iværksat nye dna-undersøgelser. De nye undersøgelser omfattede individer fra både første grav identificeret i 1991 og den nye grav fra 2007. Siden 1994, hvor de første dna-analyser blev udført, er der sket store teknologiske fremskridt, så det i 2007 nu var muligt dels at undersøge det komplette genom af mitokondrie-dna fra hvert individ foruden analyse af dele af den egentlige arvmasse (det nukleære dna eller kerne-dna).

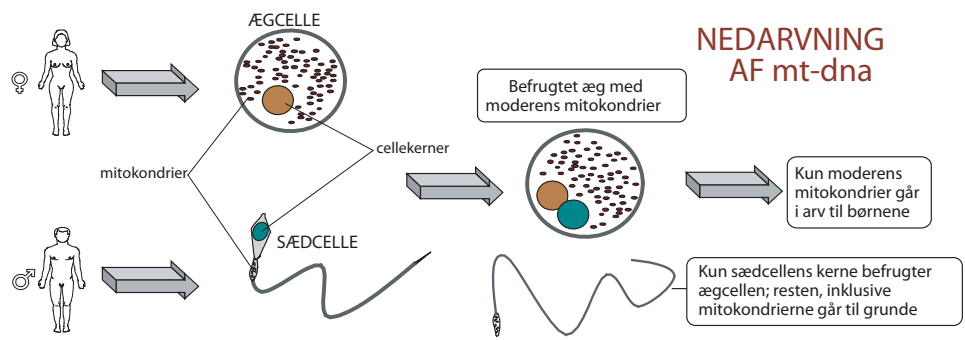
Til genetisk analyse blev der udvalgt tre nogenlunde bevarede knogler fra 2007-graven. Desuden indgik der knogler fra 1991-graven i undersøgelsen repræsenterende zaren, zarinaen og tre af deres døtre. Zarinaens kvindelinje blev repræsenteret ved nulevende slægtninge til Dronning Victoria, mens zarens kvindelinje blev repræsenteret ved en nulevende slægtning til hans mor, zarina Maria Feodorovna, kendt som prinsesse Dagmar af Danmark, datter af dronning Louise og Christian IX. En mandlig linje blev repræsenteret ved mandlige efterkommere af zar Nikolaj I, der var Nikolaj II's oldefar.

Undersøgelse af de samme sekvenser i mitokondrie-dna, som indgik i undersøgelsen fra 1994, viste, at disse sekvenser var fuldstændig ens for de tre knogler fra 2007-graven og for fire af de udvalgte knogler fra 1991-graven (kun zarens knogle gav – som ventet – et andet resultat). Dette resultat viser, at alle de undersøgte individer tilhører samme kvindelinje.

Indicierne hober sig op

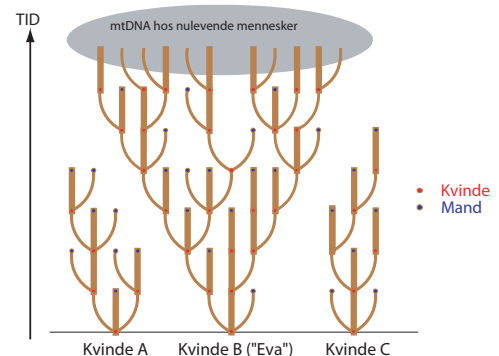
Fra to af knoglerne fra 2007-graven var der udvundet dna i så rigelige mængder, at der både kunne laves analyse af mitokondrie-dna og kerne-dna. Analyse af disse to knogler og

Dna til slægtskabsanalyse



Langt det meste af vores arvmasse (genomet) findes i kromosomerne i cellekernen og består af 24 forskellige lineære dna-molekyler, der er opbygget af 3,2 milliarder enheder (kerne-genomet eller det nukleære genom). Hver celle indeholder desuden mange kopier af en langt mindre, cirkulær dna-streng, der blot består af 16.568 enheder. Denne del af arvmassen findes inde i små strukturer kaldet mitokondrier, der er ansvarlige for cellens energiforsyning. Mitokondrier var oprindeligt frit levende bakterier, der for omkring 2,5 milliarder år siden blev optaget i "stamfaderen" til alle højerestående (eukaryote) celler. Det er grunden til, at de har deres eget genom (mitokondrie-dna, forkortet mt-dna). En gennemsnitlig menneskecelle indeholder hundredvis af mitokondrier, der hver indeholder 5-10 identiske kopier af mt-dna. Forekomsten af et så stort antal kopier per celle er forklaringen på, at det selv fra arkæologiske og palæoantropologiske levn kan lade sig gøre at udvinde analyserbart, "fossilt" mt-dna. Mitokondrie-dna er unikt ved udelukkende at være af maternal oprindelse, idet sædcellens mitokondrier ikke optages i det befrugtede æg. Dette betyder, at mt-dna nedarves fra mor til døtre og sønner og videre fra døtrene til disses børn, altså gennem rene kvindelinjer.

Hypigheden af mutationer i mt-dna er generelt ca. 10 gange større end i kerne-dna. På grund af den store hyppighed af mutationer er fylogenetiske studier baseret på mt-dna karakteriseret ved en stor »opløselighed«. Dette betyder, at analyser af mt-dna er velegnede til at afklare slægtskabsforhold mellem meget nærtstående arter og populationer. Analyser af mt-dna har i stor stil været anvendt til at klarlægge oprindelsen og den senere udbredelse af det moderne menneske, *Homo sapiens*.

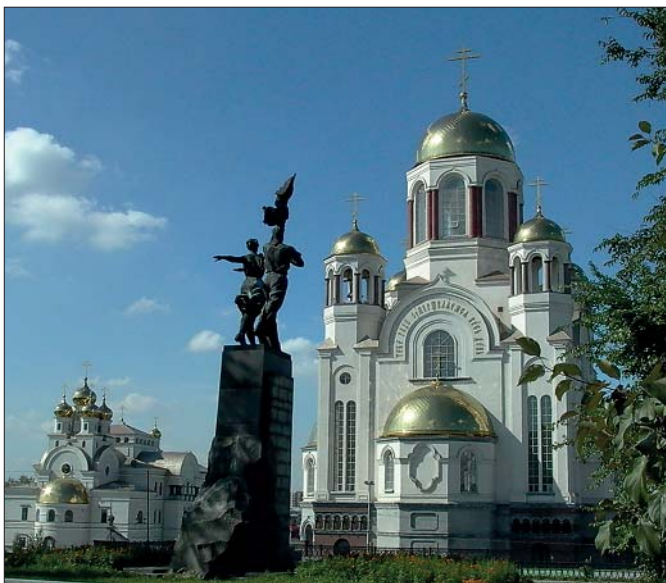


Når sædcellen befrugter ægcellen trænger kun det kerneholdige hoved ind gennem ægcellens membran; resten, inklusive mitokondrierne deltager ikke i selve befrugtningen, men går i stedet tabt. Derfor modtager fosteret kun mtDNA fra moderens ægcelle.

Modstykket til mt-dna er Y-kromosomets dna. Kun mænd har et Y-kromosom, og bortset fra eventuelle mutationer i Y-kromosomets dna-molekyle, nedarves det uforandret fra far til søn; det følger heraf, at alle "nulevende" Y-kromosomer i sidste ende kan føres tilbage til en enkelt mand på samme måde som alt "nulevende" mt-dna kan føres tilbage til en enkelt kvinde i fortiden. Y-kromosomet indeholder en meget stor sekvensvariation, der kan anvendes til analyse af slægtskab. Det har vist sig, at Y-dna er det bedst egnede genetiske system til at fastlægge oprindelsen og den efterfølgende udbredelse af *Homo sapiens* på Jorden, fordi de forskellige varianter er tæt knyttet til bestemte geografiske regioner.

	16111	16126	16169	16261	16264	16278	16293	16294	16296	16304	16311	16357	00073
CRC	C	T	C	C	C	C	A	C	C	T	T	T	A
Tjener	C	T	C	C	C	C	A	C	C	C	T	T	?
Tjener	C	T	C	C	C	C	A	C	C	T	C	T	A
Tjener	C	T	C	T	C	T	G	C	C	T	C	T	?
Læge	C	T	C	C	C	C	A	C	C	T	T	T	A
Datter	T	T	C	C	C	C	A	C	C	T	T	C	A
Datter	T	T	C	C	C	C	A	C	C	T	T	C	A
Tsarina	T	T	C	C	C	C	A	C	C	T	T	C	A
P.Philip	T	T	C	C	C	C	A	C	C	T	T	C	A
Tsar Georgij R.	C	C	C/T	C	C	C	A	T	T	T	T	T	G
H. af Fife	C	C	C/T	C	C	C	A	T	T	T	T	T	G
Xenia	C	C	T	C	C	C	A	T	T	T	T	T	G

Analyser af mitokondrie-dna af skeletterne fra graven med den formodede zar og hans familie samt af tre levende slægtninge og zarens afdøde bror (jvf. stamtræet). Der er anført resultater af sekvensbestemmelsen i forskellige positioner (numrene i øverste række). Bogstaverne er baserne (A,C,T,G). CRS er referencesequensen (Cambridge Reference Sequence). Alle afvigelser fra referencesequensen er vist med rødt. ? betyder "ikke bestemt". Bemærk angivelsen C/T for Zaren og hans bror i position 16169. Dette er en såkaldt heteroplasm, der viser, at zaren havde to forskellige populationer af mitokondrie-dna på denne position.



Blodskirken i Jekaterinburg ligger nu på den grund, hvor Ipatievhuset tidligere lå, og hvor zaren og hans familie blev myrdet.



I tre måneder blev zarfamilien holdt fanget i Ipatiev-huset for derefter at blive myrdet af bolsjevikkerne.

“zarina-knoglen” fra 1991-graven samt blodprøver fra nulevende slægtninge til Dronning Victoria viste perfekt overensstemmelse mellem de tre knogler og Victorias slægtninge. Denne Victoria-type mitokondrie-dna er ikke genfundet i nogen kendt database over sekvenser af mitokondrie-dna, så den synes at være unik for zarinaens kvindelinde.

Komplet mitokondrie-dna fra Zar-knoglen matchede med én undtagelse slægtningen til Dronning Dagmar. Også Dagmar-typen synes – som Victoria-typen – at være unik. Undtagelsen vedrører den ovennævnte heteroplasm hos zaren; denne må zaren have nedarvet fra sin moder, Dagmar. Heteroplasmien blev ikke genfundet hos den nulevende slægtning til

Dagmar, idet den som ventet var blevet til en homoplasm for T i position 16169 hos denne person.

Analysen af dna fra Y-kromosomet (den mandlige linje) viste, at alle undersøgte nulevende mandlige efterkommere af Nikolaj I har det samme Y-kromosom som Nikolaj II og den formodede prins Aleksej.

Analyse af forskellige genetiske markører (såkaldte mikrosatellit-profiler) på Y-kromosomet fra zar-knoglen og den formodede knogle fra Aleksej samt flere af ovennævnte mandlige slægtninge viste igen en unik type, der ikke er genfundet i nogen kendt database.

Til yderligere dokumentation blev der foretaget diverse dna-undersøgelser dels til fastlæggelse af individernes køn, dels

til at skelne mellem knoglerne fra 2007-graven. Disse undersøgelser bekræftede formodningerne om, hvilke knogler der stammede fra hhv. kvinder og mænd, ligesom det blev vist, at knoglerne fra 2007-graven ikke var identiske med nogen fra 1991-graven, men at de kunne repræsentere førstegrads-slægtninge til medlemmer af 1991-graven.

Ingen overlevende!

Zaren var i 1891 udsat for et attentat i forbindelse med et besøg i Japan. Zaren overlevede, men hans skjorte blev ødelagt af blodpletter. Skjorten opbevares i dag på Hermitage museet i St. Petersburg. Det er lykket at udvinde dna fra nogle af blodpletterne, og i blodpletterne fandtes den samme sjældne Dagmar-type mitokondrie-dna, som i zar-knoglen. Heteroplasmien i position 16169 blev også fundet i blodpletterne, ligesom analyse af Y-kromosomet og dna-markører fra andre kromosomer afslørede et perfekt match mellem blodpletterne og zar-knoglen. Sandsynligheden for, at denne knogle tilhører zaren og ikke en tilfældig person, hvis samtlige omtalte analyser tages i betragtning, er herefter astronomiske ($> 10^{24}$).

Resultatet af de nye dna-analyser er i fuld overensstemmelse med resultaterne af analyserne fra 1994. Det kan derfor konkluderes, at undersøgelserne overbevisende dokumenterer at 1991-graven indeholder resterne af zaren, zarinaen, døtrene Olga, Tatjana og Maria, mens 2007-graven indeholder resterne af Aleksej og Anastasia. Sandsynligheden for, at gravfundene ikke hidrører fra de pågældende er mindre end 1:100.000.000. Vi kan derfor trygt konkludere, at ingen af Romanov-familien overlevede massakren i 1918.

På det seneste har angeren over tragedien i 1918 grebet den russiske befolkning, eller i det mindste dele af den: Ipatiev-bygningen er jævnet med jorden og i stedet er der opført en katedral, Blodskirken, på tomten. ■

Om forfatteren



Peter K.A. Jensen er overlæge og klinisk lektor på Klinisk Genetisk afd., Skejby Sygehus, Aarhus Universitetshospital
E-mail: pkaj@dadlnet.dk

Yderligere information:

Oppenheimer, S: *Out of Eden*. Robinson 2004.

Maca-Meyer, N et al: *Major genomic mitochondrial lineages delineate early human expansions*. BMC Genetics 2001, 2:13.

Wells, S: *Deep ancestry*. National Geographic 2006.

Jensen, PKA: *Mennesket – den genetiske arv*. Aarhus Universitetsforlag 2006.

Forfatterens hjemmeside:
www.pkaj.dk