

УДК 57.088;575;929;7.06

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО АУТЕНТИЧНОСТИ ЛОКОНА ВОЛОС, ПРЕДСТАВЛЕННОГО КАК РЕЛИКВИЯ В МУЗЕЙНОМ ПОРТРЕТЕ ЦЕСАРЕВИЧА АЛЕКСЕЯ, СЫНА ПОСЛЕДНЕГО РОССИЙСКОГО ИМПЕРАТОРА

© 2021 Т.В. Андреева^{1,2}, А.Д. Манахов³, С.С. Кунижева¹, Е.И. Рогаев^{1,2,3,4*}

¹ Московский государственный университета имени М.В. Ломоносова,
Центр генетики и генетических технологий, биологический факультет,
кафедра генетики, 119991 Москва, Россия; электронная почта: rogaev@vigg.ru

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, отдел геномики и генетики человека,
лаборатория эволюционной геномики, 119991 Москва, Россия

³ Научно-технологический университет «Сириус», Научный Центр генетики и наук о жизни,
354340 Сочи, Краснодарский край, Россия

⁴ Медицинская школа Чан Массачусетского университета, департамент психиатрии, 01545 Шрусбери, США

Поступила в редакцию 11.11.2021

После доработки 11.11.2021

Принята к публикации 12.11.2021

Подлинность произведения искусства – это главный фактор, обуславливающий его ценность. Применение генетического подхода для определения подлинности и происхождения музейной реликвии представлено в данной работе. Были исследованы два волоска без волосяных луковиц из локона, вмонтированного в уникальный экспонат, хранящийся в Государственном историческом музее – акварельный портрет цесаревича Алексея Романова, сына последнего русского императора Николая II. С использованием методов масштабного параллельного секвенирования, а также с помощью мультиплексной ПЦР с последующим секвенированием продуктов методом Сэнгера был проведён анализ маркёров митохондриальной ДНК (мтДНК). Для сравнения использовали реконструированную нами ранее полную последовательность мтДНК цесаревича Алексея, унаследованную им по женской линии королевы Виктории [Rogaev et al. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5258–5263]. Несмотря на очень низкое качество и малое количество ДНК, которое удалось выделить из уникальных исторических образцов, нами были определены информативные маркёры мтДНК в образцах из двух единичных волос без волосяных луковиц. Было показано, что гаплотип мтДНК исследованных волос соответствует гаплотипу мтДНК цесаревича Алексея, его сестры, а также матери, императрицы Александры Фёдоровны Романовой. Этот гаплотип является уникальным и отсутствует в существующих в настоящее время базах данных последовательностей мтДНК. Полученные результаты свидетельствуют о том, что локон волос, вмонтированный в портрет, имеет отношение к семье последнего российского императора Николая II. Представленная работа является первым примером успешного применения геномного метода для оценки ценности произведения искусств и показывает перспективность внедрения генетических технологий для оценки подлинности музейных экспонатов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: древняя ДНК, музейный экспонат, волос, мтДНК, ДНК-идентификация, масштабное параллельное секвенирование.

DOI: 10.31857/S032097252112006X

ВВЕДЕНИЕ

Идентификация человека по волосам – одна из важных задач, решаемых в криминалистике. Волосы часто являются единственным источником материала для анализа и при этом наиболее ограниченным с точки зрения количества и качества содержащейся в них ДНК [1, 2]. Результаты ранее проведённых исследований, во-первых, свидетельствуют о фрагментации ДНК в волосах по мере их роста и кератинизации эпителиальных клеток [3, 4]. Во-вторых, в связи с

малым размером самого волоса, количество клеток в образцах волос, которые могут содержать ДНК, ограничено, если они вообще присутствуют. Также ранее было показано, что содержание и качество ДНК уменьшается по мере удлинения волоса [5–8]. В связи с указанными особенностями волос традиционные методы анализа ядерной ДНК, используемые в криминалистике, например, основанные на STR-маркёрах, могут быть неэффективны при проведении генетического анализа на волосах без луковиц. Митохондриальная ДНК (мтДНК) содержится в клетках в большем числе копий, чем ядерная, и она менее подвержена деградации, благодаря

* Адресат для корреспонденции.

защите дополнительной мембраной [9]. Таким образом, мтДНК является более перспективным объектом при проведении генетических экспертиз [10]. Ранее было показано, что для исследования мтДНК в волосах без волосяных луковок могут быть использованы как участки гипервариабельных регионов мтДНК, так и полная митохондриальная ДНК [11–13].

В Государственном историческом музее хранится уникальная реликвия — акварельный портрет цесаревича Алексея Романова, написанный русским художником-эмигрантом В.К. Гулевичем, с вмонтированной в него капсулой, содержащей локон волос, предположительно принадлежавший цесаревичу Алексею Романову, сыну последнего российского императора Николая II (рис. 1). Загадка происхождения реликвии остаётся нерешённой, также неизвестно, действительно ли прядь волос принадлежала сыну последнего российского императора. В данной работе мы показали, что единичные волоски из исторических и музейных экспонатов возрастом более 100 лет могут быть использованы для выделения ДНК, а анализ редких генетических вариантов митохондриальной ДНК позволяет проводить успешную ДНК-идентификацию по материнской линии для таких образцов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Уникальная реликвия — акварельный портрет русского художника-эмигранта В.К. Гулевича с вмонтированным в него локоном волос был передан Историческому музею после Второй мировой войны из Музея памяти императора Николая II, основанного в Белграде в 1936 г. белыми эмигрантами. Портрет попал в музей Белграда в 1940 г. вместе с документами, вывезенными в 1920 г. из России во Францию следователем по особо важным делам Омского окружного суда Н.А. Соколовым, расследовавшим казнь царской семьи в Екатеринбурге. После его смерти документы и некоторые вещественные доказательства поступили в Музей памяти императора в Белграде, откуда по окончании Великой Отечественной войны портрет с вмонтированным в него локоном волос был передан в Россию, в Государственный исторический музей. Обстоятельства, при которых была срезана эта прядь волос, а также возможная принадлежность цесаревичу Алексею давно вызывают вопросы у историков и сотрудников музея. Возможно, локон был сохранён кем-то, кто находился в ссылке с царской семьёй, и позже был передан следователю Н.А. Соколову.

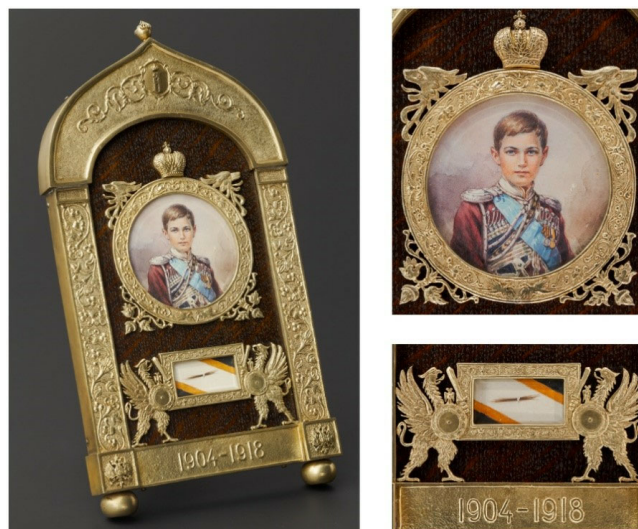


Рис. 1. Портрет цесаревича Алексея художника В.К. Гулевича с вмонтированным в него локоном волос. Портрет хранится в Государственном историческом музее (Москва, Россия)

Несколько волосков были изъяты нами из данной реликвии в Государственном историческом музее и помещены в две отдельные пробирки, обозначенные S1 и S2. Все дальнейшие операции с образцами проводили в специальной лаборатории, оборудованной для работы с древней ДНК. Мы адаптировали методологию работы с древней ДНК с некоторыми модификациями для анализа очень малого количества материала — старых образцов волос без луковок. По одному волоску из каждой пробирки (рис. 2) были взяты для выделения ДНК с использованием спин-колонок производства «Qiagen», Германия. Выделение ДНК из отдельного волоса из каждой пробирки проводили в независимых экспериментах в разные дни. Для контроля возможного загрязнения в каждом эксперименте выделения ДНК использовали отрицательные контроли выделения.

Сначала отдельные волоски, помещённые в пробирки (1,5 или 2 мл), промывали 0,5%-ным додецилсульфатом натрия и дважды стерильной водой без нуклеаз («Ambion», США). Далее выделяли ДНК с использованием набора реагентов QIAmp DNA Investigator kit («Qiagen») в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем набора для выделения ДНК из волос без волосяных луковок. Лизис образцов проводили при 56 °С 2 ч (для волоска S1) или 1 ч (для волоска S2). Выделенную ДНК элюировали в 35 мкл буфера АТЕ («Qiagen»).

В связи с очень малым ожидаемым количеством ДНК мы не проводили оценку её концентрации, а напрямую использовали для приго-

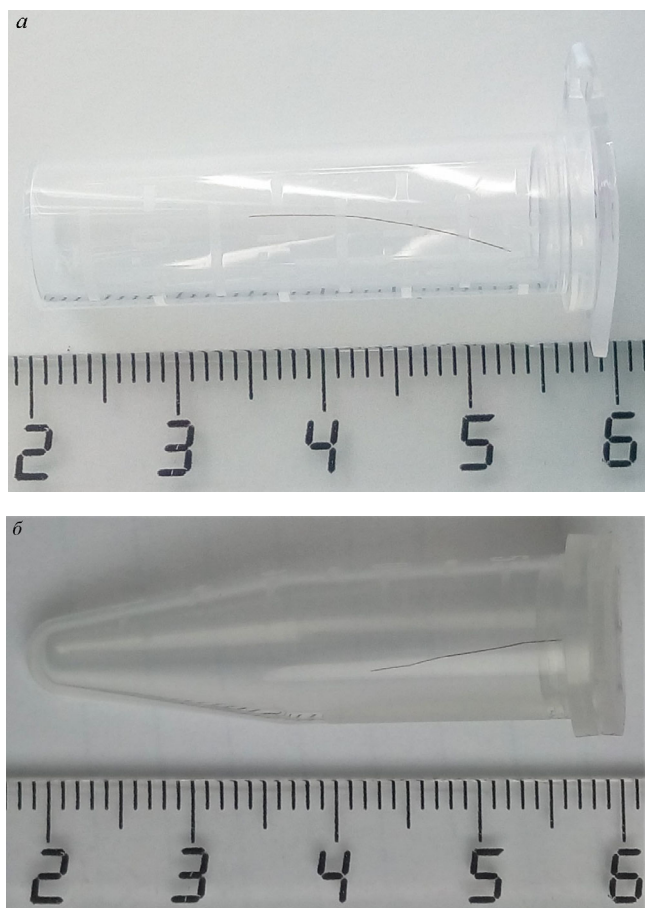


Рис. 2. Образцы волос, использованные для выделения ДНК: S1 (а) и S2 (б)

товления геномной библиотеки или ПЦР-амплификации.

Для приготовления геномной библиотеки мы адаптировали протокол, основанный на одноцепочечной ДНК [14]. При этом 8 мкл образца ДНК S2 предварительно репарировали с использованием смеси ферментов PreCR MIX («NEB», США). Готовую геномную библиотеку секвени-

ровали первоначально на приборе FGx ForenSeq («Illumina», США) и потом, для получения большего объема информации, — на приборе HiSeq2000/2500 («Illumina»). Из полученных в результате секвенирования коротких прочтений с помощью программы AdapterRemoval v2 [15] были удалены последовательности низкого качества и адаптерные последовательности. Короткие прочтения длиной более 25 п.н. были картированы на референсный геном человека (сборка hg38) и на референсную последовательность мтДНК человека (rCRS, NC_012920.1) с помощью пакета программ BWA [16] с параметрами, рекомендуемыми для анализа древней ДНК «-l 1024», «-n 0.01» и «-o 2» [17]. MapDamage2 использовали для оценки уровня замен С → Т, характерных для древней ДНК, на концах фрагментов ДНК [18].

Для прямого секвенирования участков мтДНК проводили мультиплексную амплификацию, как было описано ранее [19]. В связи с малым количеством материала и потенциальными проблемами, обусловленными малым количеством матрицы, все эксперименты проводили в нескольких повторностях.

Нами были подобраны олигонуклеотидные праймеры для амплификации коротких фрагментов ДНК, содержащих редкие варианты (частота аллеля < 0,05), выявленные нами ранее в мтДНК цесаревича Алексея Романова (табл. 1). В связи с малым количеством ДНК, выделенной из волосков, проводили два раунда ПЦР-амплификации [19]. На первом этапе в мультиплексной ПЦР амплифицировали 3 или 4 фрагмента мтДНК для волос S1 и S2 соответственно. Мультиплексная реакционная смесь объемом 40 мкл включала 20 мкл 2× QIAGEN Multiplex PCR Master Mix («Qiagen») и 2–5 мкл ДНК. В первом раунде проводили 25 циклов амплификации. Затем 1 мкл полученных продуктов мультиплексной ПЦР использовали для второго раунда ПЦР с индивидуальными

Таблица 1. Последовательности праймеров для анализа редких вариантов в последовательности мтДНК цесаревича Алексея

Координаты мтДНК (NC_012920.1)	Аллель цесаревича Алексея [19]	Частота аллеля	Последовательность прямого, обратного праймера	Размер ПЦР-продукта (п.н.)
524	524.1C 524.2A	0,035	attattttcccctcccactcc, tgtctttggggtttggttg	120
4137	T	0,0001	gagttggtcgtagcggaaatcg, tcctaggaacaacatgatgacgca	131
16111	T	0,054*	accatcaacaaccgctatg, agggggtttgatgtgatt	120
16357	C	0,0033	aaacctaccacccttaca, gtcaaggaccctatctg	118

Примечание. * Вариант 16 111T был включён в анализ в связи с крайне низкой частотой встречаемости в европейских популяциях (частота аллеля T – 0,003).

ми парами праймеров для каждого локуса (табл. 1). 30 Циклов амплификации проводили с использованием системы PicoMaxx High Fidelity PCR System («Agilent Technology», США) в объёме 20 мкл. Полученные таким образом ПЦР-фрагменты секвенировали с использованием набора реагентов BigDye Terminator v3.1 («Applied Biosystems», США) на приборе 3730xl DNA Analyzer («Applied Biosystems»). Секвенирование проводили для каждого продукта ПЦР с использованием как прямого, так и обратного праймеров. Два независимых мультиплексных эксперимента были поставлены для ДНК из волоса S1, и 3 повтора были сделаны для ДНК из волоса S2, в каждом эксперименте использовали отрицательные контроли процедур выделения ДНК и амплификации.

Для определения частот встречаемости исследуемых вариантов мтДНК мы использовали базы данных митохондриальных последовательностей EMPOP (<http://empop.online/>) и Mitomap (<http://mitomap.org/MITOMAP>). Отношение правдоподобия (LR) рассчитывали, используя односторонний доверительный интервал, по стандартной формуле $LR = x/y$, где x – вероятность того, что исследуемый и сравниваемый гаплотипы принадлежат к одной и той же материнской линии, а y – вероятность того, что исследуемый образец принадлежит неродственному (или случайно родственному) индивиду из базы данных. В данном случае x всегда принимается за 1, а y – односторонний 95%-ный доверительный интервал [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полногеномное секвенирование. Экстракт ДНК S2 использовали для приготовления геномной библиотеки по протоколу, основанному на использовании одноцепочечных фрагментов ДНК [14]. Подготовленная библиотека была просеквенирована на платформе Illumina, в общей сложности было получено 97 млн «сырых» прочтений. Большая часть прочтений, прошедших через процедуру удаления адаптерных последовательностей и фильтрацию по качеству, оказались очень короткими. Только 6 млн прочтений (~6% от исходного набора данных), с длиной фрагментов ДНК более 25 п.н. (табл. 2, рис. 3), были использованы для последующего анализа. Фрагменты, картированные на референсную последовательность мтДНК (rCRS), содержали на концах специфичные для древней ДНК замены $C \rightarrow T$ (рис. 4).

Всего лишь 259 коротких прочтений были картированы на референсную последователь-

ность мтДНК человека, что недостаточно для её полного покрытия и реконструкции. Тем не менее нам удалось провести анализ полученных данных на предмет присутствия в них маркёров мтДНК, которые ранее были выявлены в мтДНК цесаревича Алексея [19]. Мы обнаружили 5 таких маркёрных позиций мтДНК, каждая из которых была покрыта по меньшей мере одним прочтением, содержащим замену, характерную для мтДНК цесаревича Алексея, включая позиции, содержащие редкие генетические варианты (16 111 и 16 357, табл. 3).

Секвенирование по методу Сэнгера. Используя образцы ДНК, выделенные из обоих волос S1 и S2, нам удалось амплифицировать участки мтДНК, содержащие редкие аллельные варианты, присутствующие в ранее опубликованных митохондриальных последовательностях цесаревича Алексея Романова [19]. Ни в одном из отрицательных контролей специфических фрагментов выявлено не было (рис. 5).

В результате секвенирования методом Сэнгера трёх индивидуальных ПЦР-продуктов для образца S1 и четырёх – для образца S2 были реконструированы последовательности соответствующих фрагментов мтДНК. Для обоих волос во всех исследуемых позициях были выявлены генетические варианты, совпадающие с вариантами мтДНК цесаревича Алексея (рис. 6).

Статистический анализ. Расчёт отношения правдоподобия (LR) проводили по методу Holland и Parsons [20] с использованием частот встречаемости гаплотипов мтДНК, реконструированных в результате секвенирования, в базах данных EMPOP и MITOMAP (табл. 4). Результаты оценки правдоподобия показывают, что вероятность того, что исследованные образцы волос принадлежат цесаревичу Алексею или родственникам Александры Фёдоровны Романовой по материнской линии королевы Виктории, чьи мтДНК идентичны, не менее чем в $4,3 \times 10^3$ – $5,3 \times 10^4$ раз (в зависимости от числа индивидов, представленных в базе данных) выше вероятности, что изученные образцы волос принадлежат случайному неродственному индивиду.

Необходимость исследования произведений искусства обусловлена не только их эстетичес-

Таблица 2. Результаты секвенирования библиотеки, приготовленной из ДНК образца S2, на платформе Illumina

Всего прочтений	Прочтений, прошедших фильтрацию	Картировано на геном человека (hg38)	Картировано на мтДНК человека (rCRS)
97 300 168	6 174 682	943 795 (15,28%)	259

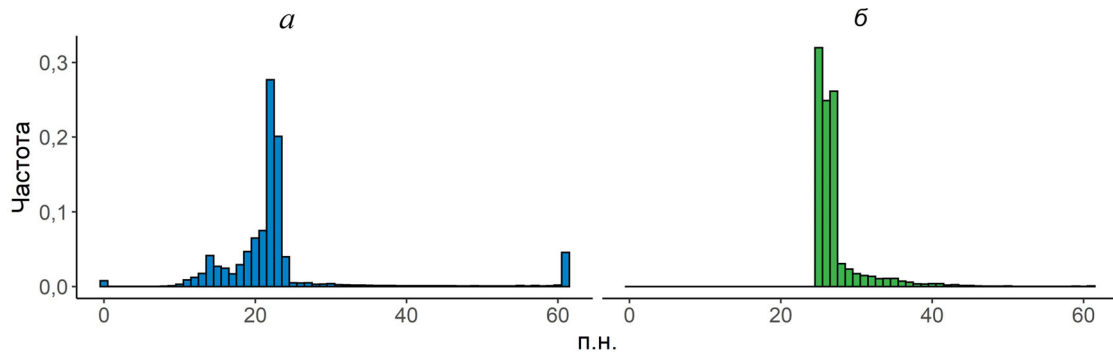


Рис. 3. Распределение длин прочтений после фильтрации по качеству и удаления адаптерных последовательностей программой AdapterRemoval (а) и прочтений, длиной более 25 п.н., картированных на мтДНК человека (б)

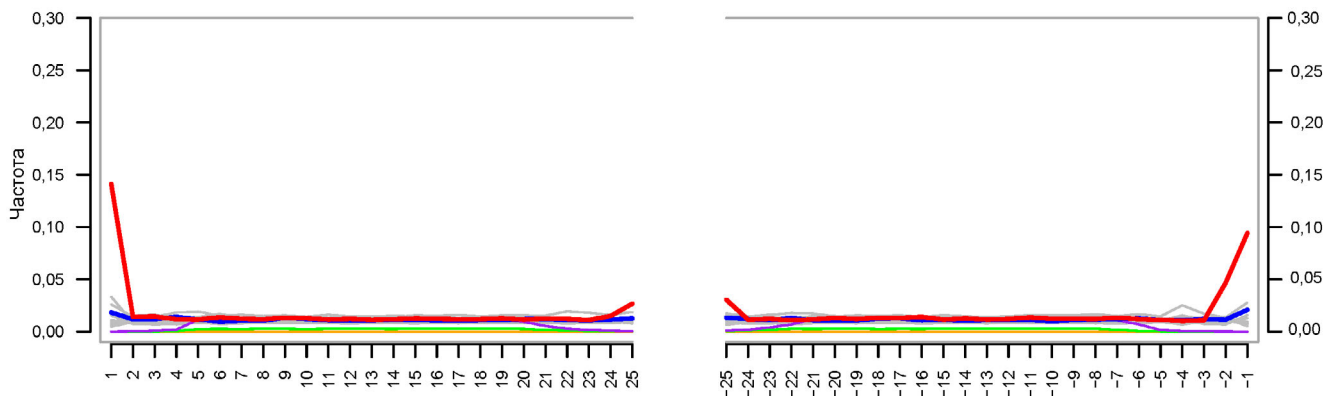


Рис. 4. Профиль нуклеотидных замен, полученный с использованием программы mapDamage2 [18] для прочтений образца S2, картированных на мтДНК человека. По оси X указана нуклеотидная позиция в прочтении. Наблюдается повышение уровня замен С → Т (красный) к концам фрагментов, специфичное для древней ДНК и обусловленное постмортальными модификациями ДНК, что подтверждает подлинность древней ДНК, полученной из стержня волоса

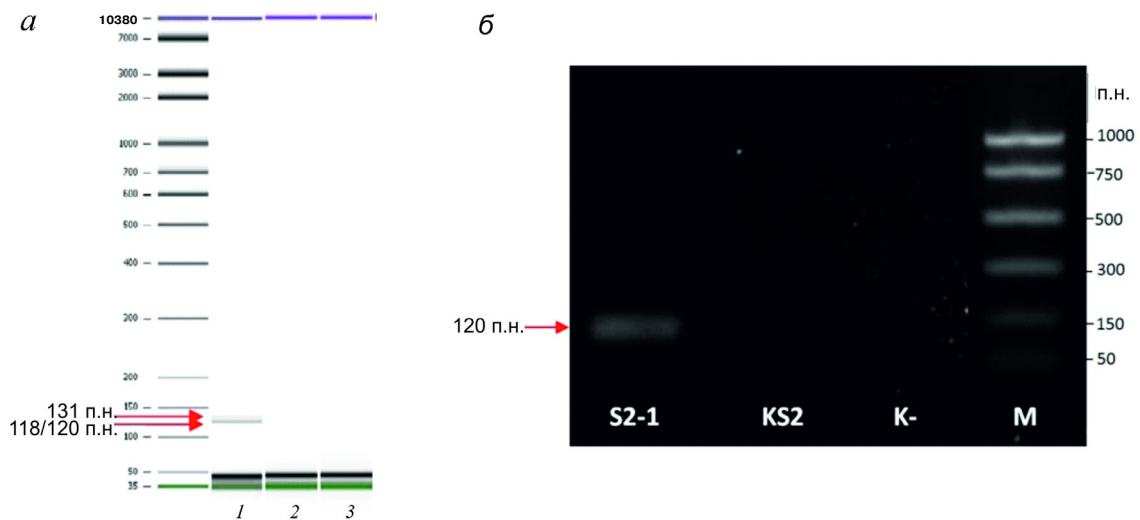


Рис. 5. Ампликоны, полученные в результате мультиплексной ПЦР (а) и вторичной амплификации с индивидуальными парами праймеров для позиции 524 мтДНК (б). 1 – Образец S2; 2 – отрицательный контроль выделения ДНК; 3 – отрицательный контроль мультиплексной ПЦР; KS2 – отрицательный контроль вторичной ПЦР с индивидуальными праймерами, проведённой на отрицательном контроле выделения ДНК; К– – отрицательный контроль ПЦР с индивидуальными праймерами; М – маркёр размера ДНК

Таблица 3. Характерные для материнской линии цесаревича Алексея варианты мтДНК, выявленные при секвенировании образца S2

Позиция мтДНК	Референсный аллель	Аллель, обнаруженный в S2	Число прочтений, содержащих альтернативный аллель	Частота по базе GnomAD
750	A	G	1	0.98
1438	A	G	1	0.96
16111	C	T	4	0.054
16357	T	C	1	0.003
16519	T	C	3	0.66

кой значимостью, но и историческими аспектами их создания и происхождения. В данной работе мы адаптировали и применили методы анализа древней ДНК для проверки подлинности ценного музейного экспоната – пряди волос, смонтированной в акварельный портрет цеса-

евича Алексея Романова – сына последнего российского императора Николая II.

В результате проведённого исследования волос без луковиц из исторического произведения искусства нами был выявлен высокий уровень фрагментации содержащейся в них ДНК (преобладающая длина фрагментов ДНК составляет менее 25 п.н.), что затрудняет проведение генетического анализа [5–8]. Однако мы показали, что несмотря на крайне малое количество высококодированной ДНК, выделенной из единичных исторических старых волос, она всё же может быть успешно использована для генетического анализа как с применением классических методов (ПЦР и секвенирование по Сэнгеру), так и с помощью новых методов масштабного параллельного секвенирования.

Анализ мтДНК показал, что гаплотип, выявленный в образцах волос, совпадает с ранее опубликованным гаплотипом мтДНК цесаревича Алексея, его сестры Марии и их матери – императрицы Александры Фёдоровны [19] (табл. 5). Мы не обнаружили этот гаплотип ни в одной из

Таблица 4. Частоты встречаемости выявленного гаплотипа и отношения правдоподобия (LR) по базам данных EMPOP и MITOMAP

База данных (число последовательностей в базе)	Число совпадений	Оценочная частота гаплотипа [#]	Частота гаплотипа, 95%-ный доверительный интервал	LR	LR, 95%-ный доверительный интервал
EMPOP ¹ (4289)	0	0,00023	0,00070	4,3×10 ³	1,4×10 ³
EMPOP ² (38361)	0	0,00003	0,00008	3,8×10 ⁴	1,3×10 ⁴
MITOMAP ³ (52633)	0 (3*)	0,00002	0,00006	5,3×10 ⁴	1,8×10 ⁴

¹ База EMPOP, полные последовательности мтДНК.

² База EMPOP, контрольный регион мтДНК (16024–576).

³ База MITOMAP, полные последовательности мтДНК.

* Последовательности мтДНК Императрицы Александры Фёдоровны (FJ656214.1), цесаревича Алексея (FJ656216.1) и Великой Княжны Марии (FJ656217.1) были включены ранее в базу MITOMAP [19].

[#] Рассчитана по [20].

Таблица 5. Варианты мтДНК, выявленные в образцах волос, смонтированных в портрет царевича Алексея, и у представителей женской линии королевы Виктории

Позиция мтДНК	Референсный вариант	Прядь волос	Алексей (N146)*	Мария (N147)*	Александра Фёдоровна (N7)*	Родственники королевы Виктории по материнской линии*
524,1	–	C	C	C	C	C
524,2	–	A	A	A	A	A
750	A	G	G	G	G	G
1438	A	G	G	G	G	G
16111	C	T	T	T	T	T
16357	T	C	C	C	C	C
16519	T	C	C	C	C	C

* Данные из [19].

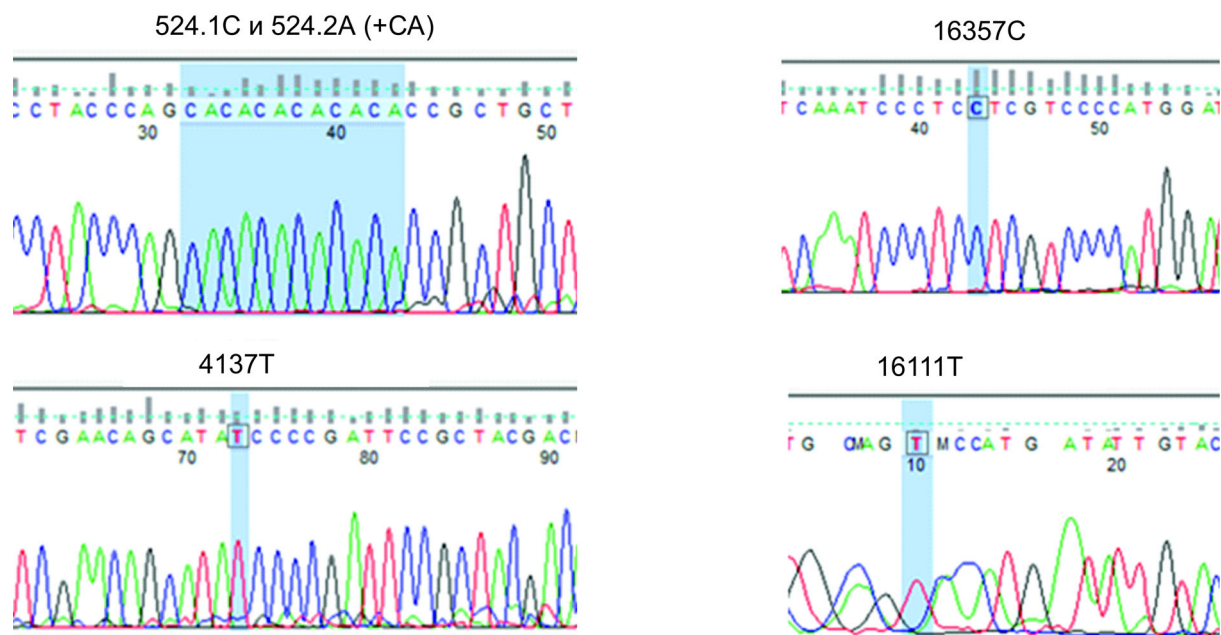


Рис. 6. Электрофореграмма секвенирования методом Сэнгера фрагментов мтДНК волоса S2. Синими рамками отмечены позиции с редкими генетическими вариантами, ранее выявленными в мтДНК цесаревича Алексея

проанализированных баз данных, за исключением гаплотипов у трёх индивидов, опубликованных нами ранее, которые представлены в базе данных MITOMAP, и принадлежащих императрице Александре Фёдоровне (FJ656214.1), цесаревичу Алексею (FJ656216.1) и великой княжне Марии (FJ656217.1) [19]. Таким образом, полученные нами данные показывают принадлежность локона волос, смонтированного в портрет цесаревича Алексея, прямому родственнику королевы Виктории и Александры Фёдоровны Романовой (внучка королевы Виктории и мать царевича Алексея) по женской линии. Это подтверждает гипотезу о происхождении данной реликвии от цесаревича Алексея.

Финансирование. Данная работа была частично поддержана проектом Минобрнауки России, системный номер 075-10-2020-116 (грант № 13.1902.21.0023) (разработка методов геномного секвенирования и анализа древней ДНК).

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам Государственного Исторического Музея Евгению Лукьянову и Алексею Константиновичу Левыкину за предоставление материалов, фотографий портрета и оказанную в ходе проведения исследования поддержку.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pfeiffer, H., Hühne, J., Ortmann, C., Waterkamp, K., Brinkmann, B. (1999) Mitochondrial DNA typing from human axillary, pubic and head hair shafts – success rates and sequence comparisons, *Int. J. Legal Med.*, **112**, 287-290, doi: 10.1007/s004140050251.
- Graham, E. A. M. (2007) DNA reviews: ancient DNA, *Forensic Sci. Med. Pathol.*, **3**, 221-225.
- Brandhagen, M. D., Loreille, O., and Irwin, J. A. (2018) Fragmented nuclear DNA is the predominant genetic material in human hair shafts, *Genes (Basel)*, **9**, 640, doi: 10.3390/genes9120640.
- Bengtsson, C. F., Olsen, M. E., Brandt, L. Ø., Bertelsen, M. F., Willerslev, E., et al. (2012) DNA from keratinous tissue. Part I: Hair and nail, *Ann. Anat.*, **194**, 17-25, doi: 10.1016/j.aanat.2011.03.013.
- Linch, C. A., Whiting, D. A., and Holland, M. M. (2001) Human Hair histogenesis for the mitochondrial DNA forensic scientist, *J. Forensic Sci.*, **46**, 15056J, doi: 10.1520/jfs15056j.
- Almeida, M., Betancor, E., Fregel, R., Suárez, N. M., and Pestano, J. (2011) Efficient DNA extraction from hair shafts, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, **3**, E319-E320, doi: 10.1016/j.fsigss.2011.09.022.
- Müller, K., Klein, R., Miltner, E., and Wiegand, P. (2007) Improved STR typing of telogen hair root and hair shaft DNA, *Electrophoresis*, **28**, 2835-2842, doi: 10.1002/elps.200600669.

8. Desmyter, S., Bodner, M., Huber, G., Dognaux, S., Berger, C., et al. (2016) Hairy matters: MtDNA quantity and sequence variation along and among human head hairs, *Forensic Sci. Int. Genet.*, **25**, 1-9, doi: 10.1016/j.fsigen.2016.07.012.
9. Budowle, B., Allard, M. W., Wilson, M. R., and Chakraborty, R. (2003) Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **4**, 119-141.
10. Allen, M., Engström, A.-S., Meyers, S., Handt, O., Saldeen, T., (1998) Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities, *J. Forensic Sci.*, **43**, 16169J, doi: 10.1520/jfs16169j.
11. Irwin, J. A., Saunier, J. L., Strouss, K. M., Sturk, K. A., Diegoli, T. M., (2007) Development and expansion of high-quality control region databases to improve forensic mtDNA evidence interpretation, *Forensic Sci. Int. Genet.*, **1**, 154-157, doi: 10.1016/j.fsigen.2007.01.019.
12. Just, R. S., Scheible, M. K., Fast, S. A., Sturk-Andreaggi, K., Röck, A. W., et al. (2015) Full mtGenome reference data: development and characterization of 588 forensic-quality haplotypes representing three U. S. populations, *Forensic Sci. Int. Genet.*, **14**, 141-155, doi: 10.1016/j.fsigen.2014.09.021.
13. McElhoe, J. A., Holland, M. M., Makova, K. D., Su, M. S. W., Paul, I. M., (2014) Development and assessment of an optimized next-generation DNA sequencing approach for the mtgenome using the Illumina MiSeq, *Forensic Sci. Int. Genet.*, **13**, 20-29, doi: 10.1016/j.fsigen.2014.05.007.
14. Gansauge, M.-T., Gerber, T., Glocke, I., Korlevic, P., Lippik, L., (2017) Single-stranded DNA library preparation from highly degraded DNA using T4 DNA ligase, *Nucleic Acids Res.*, **45**, e79, doi: 10.1093/nar/gkx033.
15. Schubert, M., Lindgreen, S., and Orlando, L. (2016) AdapterRemoval v2: rapid adapter trimming, identification, and read merging, *BMC Res. Notes*, **9**, 88, doi: 10.1186/s13104-016-1900-2.
16. Li, H., and Durbin, R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform, *Bioinformatics*, **25**, 1754-1760, doi: 10.1093/bioinformatics/btp324.
17. Schubert, M., Ginolhac, A., Lindgreen, S., Thompson, J. F., Al-Rasheid, K. A. S., et al. (2012) Improving ancient DNA read mapping against modern reference genomes, *BMC Genomics*, **13**, 178, doi: 10.1186/1471-2164-13-178.
18. Jónsson, H., Ginolhac, A., Schubert, M., Johnson, P. L. F., and Orlando, L. (2013) mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters, *Bioinformatics*, **29**, 1682-1684, doi: 10.1093/bioinformatics/btt193.
19. Rogaev, E. I., Grigorenko, A. P., Moliaka, Y. K., Faskhutdinova, G., Goltsov, A., et al. (2009) Genomic identification in the historical case of the Nicholas II royal family, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5258-5263, doi: 10.1073/pnas.0811190106.
20. Holland, M. M., and Parsons, T. J. (1999) Mitochondrial DNA sequence analysis – validation and use for forensic casework, *Forensic Sci. Rev.*, **11**, 21-50.

GENETIC EVIDENCE OF AUTHENTICITY OF A HAIR SHAFT RELIC FROM THE PORTRAIT OF TSESAREVICH ALEXEI, SON OF THE LAST RUSSIAN EMPEROR

T. V. Andreeva^{1,2}, A. D. Manakhov³, S. S. Kunizheva¹, and E. I. Rogaev^{1,2,3,4*}

¹ *Centre for Genetics and Genetic Technologies, Department of Genetics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119192 Moscow, Russia; E-mail: rogaev@vigg.ru*

² *Department of Genomics and Human Genetics, Laboratory of Evolutionary Genomics, Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, 119333 Moscow, Russia*

³ *Center for Genetics and Life Science, Sirius University of Science and Technology, 354340 Sochi, Russia*

⁴ *Department of Psychiatry, UMass Chan Medical School, 222 Maple Ave, Reed-Rose-Gordon Building, Shrewsbury, MA 01545, USA*

To determine the value of a piece of art, authenticity of the artwork must be verified. We demonstrate here a genetic approach to determine origin of a historic relic in the museum piece. We tested two hair shafts of unknown origin framed into a watercolor portrait of Tsesarevich Alexei Romanov, son of the last Russian Tzar Nicholas II, which is a unique item kept in the State Historical Museum. Genetic identification of the hair shafts was performed by analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) markers using both massive parallel genomic sequencing and multiplex targeted PCR, followed by Sanger sequencing. In previous works, we reconstructed the complete mtDNA sequence inherited to Alexei Romanov through the Queen Victoria lineage [Rogaev et al. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5258-5263]. DNA extracts were obtained from the two thin hair shafts and used for comparative genetic analysis. Despite the very low quantity and quality of the DNA templates retrieved from the historical single hair shaft specimen, informative mtDNA sequences were determined. The mtDNA haplotype in the hair shafts corresponds to the mtDNA haplotype of Tsarevich Alexei, his sisters, and his mother, Empress Alexandra Feodorovna. This haplotype remains unique in the currently available mtDNA databases. Our results reveal that the hair relic from the portrait is associated with the family of the last Russian Emperor Nicholas II. The study is an example of primary application of the genetic methodology for verification of the value of museum artwork items.

Keywords: ancient DNA, museum item, hair shaft DNA, mtDNA, human identification, NGS