

Vaje iz predmeta sodna medicina

FORENZIČNA GENETIKA

Pripravila

Znanstvena svetnica in doc. dr. Irena Zupanič Pajnič, univ. dipl. biol
Laboratorij za molekularno genetiko, Inštitut za sodno medicino, MF v Ljubljani
irena.zupanic@mf.uni-lj.si

Ljubljana, 2018

UVOD

Na Inštitutu za sodno medicino Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani že od leta 1996 opravljamo molekularno genetske identifikacije oseb in bioloških sledi ter preverjamo sorodstvene povezave. Prvotne preiskave smo usmerili v raziskave polimorfizmov mikrosatelitskih področij avtosomalne jedrne DNA (1, 2), sledile so jim raziskave polimorfizmov mikrosatelitskih področij kromosoma Y (3) in preiskave polimorfizmov mitohondrijske DNA - mtDNA (4, 5), saj tipizacija jedrne DNA pri starih in slabo ohranjenih bioloških materialih zaradi močne razgradnje vedno ni bila uspešna. Za preverjanje sorodstvenih povezav (zlasti spornih očetovstev) in identifikacijo oseb iz razmeroma dobro ohranjenih bioloških materialov izoliramo genomsko DNA iz naslednjih bioloških vzorcev: kri in krvni madeži, slina in sledovi slin v kriminalističnih primerih (cigaretne ogorki, poštna znamke, zobne ščetke), tkiva, odvzeta pri obdukciji, sperma in vaginalni brisi, odvzeti po posilstvu, lasje z lasno korenino, prhljaj, citološki in histološki preparati, tkiva, vpeta v parafinske bloke, epiteljske celice na prstnem odtisu (kontaktne sledi),... Iz starih bioloških materialov (skeletalni ostanki, zobje), slabo ohranjenih bioloških vzorcev (v eksplozijah, požarih ali prometnih nesrečah zoglenela in močno poškodovana trupla), iz starega fecesa ter mikrosledov v kriminalističnih primerih (izpadli lasje, ki so običajno brez korenin) pogosto ni moč izolirati dovolj kvalitetne jedrne DNA za uspešno tipizacijo mikrosatelitskih področij, pričakujemo pa lahko uspešno tipizacijo mtDNA. Ob metodi genetskega profiliranja jedrne DNA nam tipizacija mtDNA v rutinskih preiskavah omogoča celosten pristop k molekularno genetskim identifikacijam biološkega materiala v sodni medicini in kriminalistiki. Tako smo v zadnjih letih uspešno identificirali žrtve povojnih množičnih grobišč (6-10). Genetsko smo obdelali deset grobišč iz obdobja druge svetovne vojne, za katera so v glavnem bili na razpolago poimenski sezname žrtev, na osnovi katerih smo lahko zbrali primerjalne vzorce ustnih sluznic še živečih sorodnikov. V Laboratoriju za molekularno genetiko ISM smo opravili molekularno genetsko preiskavo skeletnih ostankov domnevnih članov rodbine Auersperg iz konca 17. in začetka 18. stoletja.

Na Inštitutu za sodno medicino opravljamo naslednje forenzično genetske in klinične preiskave:

1. preverjanje sorodstvenih odnosov (bližnji sorodstveni odnosi kot so sporna očetovstva in daljne sorodstvene povezave) (11),

2. identifikacija bioloških sledi v kriminalističnih primerih (umori, posilstva, ropi, rekonstrukcija prometnih nesreč in iskanje sledi voznika,...) (12, 13),
3. identifikacija skeletiziranih posmrtnih ostankov ter razpadlih in zогlenelih trupel (neznana trupla in masovne katastrofe) (14),
4. identifikacija tkivnih vzorcev ali preverjanje identitete bioloških vzorcev ob sumu na njihovo zamenjavo (biopsijski vzorci, vzorci odvzeti za alkoholimetrične in toksikološke preiskave) (15),
5. spremljanje uspešnosti transplantacije kostnega mozga oziroma krvotvornih matičnih celic (določanje himerizma hematopoetskih celic prejemnika – pacienta) (16),
6. določanje zigotnosti pri dvojčkih
7. identifikacija žrtev 2. svetovne vojne (6 - 10),
8. identifikacija skeletnih ostankov iz arheoloških najdišč.

Molekularno genetske metode za identifikacijo biološkega materiala in preverjanje sorodstvenih povezav se od začetka 90. let uporabljajo v sodnomedicinskih, kriminalističnih, paleoantropoloških in genealoških študijah, pa tudi študijah muzejskih živalskih in rastlinskih materialov (17, 18). Z metodo genetskega profiliranja določamo alelnе vzorce ali genetske profile jedrne DNA. Ta metoda nam prvič v zgodovini omogoča pozitivno identifikacijo in ne le izključitve. Vse predhodne metode so namreč uporabljale serološke in biokemične označevalce, ki so imeli prenizko variabilnost, da bi lahko natančno določili identiteto vzorca (19). Zelo uspešno uporabo polimorfizmov DNA je omogočilo odkritje verižne reakcije s polimerazo - t.i. reakcija PCR (angl. Polymerase Chain Reaction), s katero je danes možna uspešna identifikacija las, slin iz cigaretneга ogorka, slin iz poštnе znamke, prhljaja, epiteljskih celic na prstnem odtisu (kontaktne sledi) in paleoantropološkega biološkega materiala (20).

Uspešnost genetskih identifikacijskih metod je odvisna od količine in kvalitete izolirane DNA in torej od ohranjenosti biološkega materiala, ki ga želimo preučevati. Pri svežih tkivih in relativno dobro ohranjenih bioloških vzorcih z metodo genetskega profiliranja analiziramo dolžinske polimorfizme jedrne DNA (avtosomalne kromosome in kromosom Y). Pri starih in problematičnih vzorcih pa se lahko zgodi, da zaradi močne razgradnje jedrne DNA ni moč pridobiti v zadostnih količinah. V takih primerih se poslužujemo sekvenčnih polimorfizmov mitohondrijske DNA (mtDNA). Problematične biološke vzorce predstavljajo stari skeletni ostanki in zobje, slabo ohranjeni ali močno poškodovani človeški posmrtni ostanki (v

letalskih, železniških in prometnih nesrečah, eksplozijah in požarih zoglenela in močno poškodovana trupla, žrtve naravnih nesreč, terorističnih napadov ali vojn), stari nohti, feces in urin ter mikrosledovi v kriminalističnih primerih (zlasti izpadli telogeni lasje, ki jih kriminalisti pogosto najdejo na kraju kaznivega dejanja) (5).

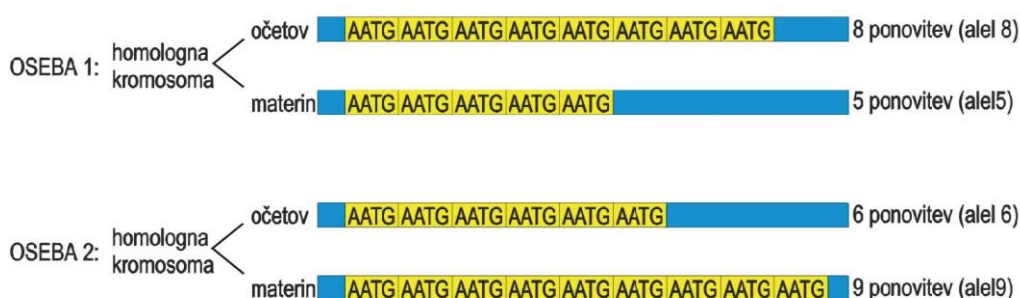
PREISKAVE JEDRNE DNA

Na jedrni DNA opravljamo dve vrsti preiskav. Prva je preiskava avtosomalnih kromosomov, druga pa preiskava spolnih kromosomov, zlasti moškega spolnega kromosoma Y. Oba tipa preiskav uporabljamo za reševanje različnih sodnomoedicinskih primerov. Vzrok za to so razlike v načinu dedovanja avtosomov in kromosoma Y ter velike razlike v diskriminacijskem potencialu obeh tipov preiskav (21).

Avtosomalna DNA

Je najbolj polimorfna, zato jo najpogosteje preiskujemo, tako pri preverjanju bližnjih sorodstvenih povezav kot pri identifikacijskih testih. Avtosomalni genetski profil lahko določimo vsem biološkim vzorcem, ki vsebujejo celice s celičnim jedrom, v katerih se nahaja DNA. Analiziramo mikrosatelite ali kratke tandemske ponovitve, ki jih označujemo s kratico STR, kar v angleščini pomeni Short Tandem Repeat. Področja STR predstavljajo individualno najbolj specifične odseke človeškega genoma. Njihova variabilnost znotraj populacije je tako visoka, da lahko z uporabo večjega števila področij STR med seboj razlikujemo katerikoli osebi, razen enojajčnih dvojčkov, katerih dednina je identična. Pripadajo nekodogeni DNA in ne kodirajo proteinov ter so raztreseni po vsem genomu. So nevtralni, kar pomeni, da ne nosijo nobene informacije o fenotipskih lastnostih posameznika in nam omogočajo le ugotavljanje identitete. Področja STR imajo obliko kratkih, tandemske ponovljenih nukleotidnih zaporedij, t.i. osnovnih motivov, ki se ponavljajo v številnih identičnih ali sorodnih kopijah. Dolžinski polimorfizem področij STR torej temelji na variacijah v številu ponovitev osnovnega motiva. Ljudje se med seboj razlikujemo v številu ponovitev osnovnega motiva preiskovanih področij STR. Na vsakem avtosomalnem področju STR imamo dva alela. Enega smo podedovali po materi in drugega po očetu. Alele označujemo s številkami, ki predstavljajo število ponovitev osnovnega motiva. Forenzična področja STR imajo v glavnem osnovni motiv dolžine 4 nukleotidov, njihova skupna dolžina pa ne presega 400 nukleotidov (21).

Na Sliki 1 je shematsko prikazan dolžinski polimorfizem enega od področij oziroma lokusov STR. Osnovni motivi so obarvani rumeno, njihovo nukleotidno zaporedje je AATG, mejna področja lokusa pa so obarvana modro. Obe prikazani osebi imata zaradi različnega števila ponovitev osnovnega motiva na lokusu različno dolge alele. Tako ima oseba 1 na enem kromosomu 8 ponovitev osnovnega motiva in na homolognem kromosomu 5 ponovitev, oseba 2 pa ima 6 in 9 ponovitev osnovnega motiva.



Slika 1: Shematski prikaz dolžinskega polimorfizma lokusa STR.

Rodovniške analize so pokazale, da se področja STR razporejajo neodvisno iz staršev na potomce, kažejo kodominantno naravo alelov in se dedujejo strogo po Mendlovih zakonih dedovanja, po katerih otrok vedno podeduje en alel od matere in enega od očeta. Na tej osnovi temeljijo preverjanja spornih očetovstev in vse ostale preiskave, pri katerih ugotavljamo bližnje sorodstvene povezave med posamezniki. Identifikacijski testi, pri katerih iščemo popolno identičnost genetskih profilov analiziranih vzorcev in jih najpogosteje uporabljamo v kriminalističnih primerih, pa temeljijo na predpostavki, da imajo vsa tkiva posameznika enak genotip. Po pomnožitvi večjega števila področij STR v verižni reakciji s polimerazo in ločitvi produktov reakcije s kapilarno elektroforezo, dobimo individualno specifičen alelni vzorec ali genetski profil (imenujemo ga tudi DNA-profil ali STR-profil) preiskovanih mikrosatelitov posameznika ali biološke sledi. Profile lahko med seboj primerjamo in ugotavljamo, ali imajo skupen izvor ali ne. Kadar se dva profila med seboj ne ujemata, biološka vzorca nimata skupnega izvora. Ob popolnem ujemaju genetskih profilov pa potrdimo skupen izvor vzorcev.

S preiskavo 15 avtosomalnih področij STR dosegamo pri identifikacijskih testih verjetnost ujemanja dveh naključno izbranih in sorodstveno nepovezanih oseb približno 10^{-15} (1 oseba v

populaciji, velikosti 10^{15}). V primerjavi z velikostjo celotne človeške populacije (7×10^9) kaže ta verjetnost edinstvenost genetskih profilov. Pri preverjanju spornih očetovstev pa dosegamo verjetnost očetovsta, ki v glavnem presega vrednost 99,999 %. Po mednarodnih priporočilih mora za potrditev daljnega sorodstvenega odnosa ta verjetnost dosegati vrednost vsaj 99,9 %.

Preverjanje sorodstvenih povezav

Najpogosteje uporabljamo teste ugotavljanja bližnjih sorodstvenih povezav za preverjanje starševstva oz. spornih očetovstev, saj običajno materinstva niso sporna (razen pri detomorih). Očetovstvo potrdimo, ko je potrditev prisotna na vseh 15 področjih STR, izključimo pa, ko so izključitve prisotne na vsaj treh analiziranih področjih STR. Izključitev na enem ali dveh področjih bi namreč lahko bila posledica naključne mutacije.

Poleg preverjanja spornih očetovstev so testi dokazovanja bližnjih sorodstvenih povezav uporabni tudi za reševanje imigracijskih primerov, s katerimi se je že v preteklosti v Evropi najpogosteje srečevala Velika Britanija (22). Po britanskem zakonu imajo imigranti s stalnim bivališčem pravico zahtevati stalno bivališče tudi za najbližje sorodnike, pri čemer morajo dokazati prvostopenjsko sorodstveno povezavo. Nadalje te teste uporabljamo za preverjanje družinskih sorodstvenih odnosov v grobiščih (primer je identifikacija ruske vladarske družine Romanov) in pa za identifikacijo posmrtnih ostankov z reverznimi testi starševstva. Pri teh testih preverjamo, ali imajo posmrtni ostanki domnevnega sina ali hčerke genetski profil, ki ustreza genetskemu profilu otroka še živečih analiziranih staršev. Uporabljamo jih pri masovnih katastrofah, kot so letalske nesreče in potresi ter pri identifikacijah posmrtnih ostankov v množičnih grobiščih. Pri vseh masovnih katastrofah, kjer začnejo z identificiranjem pogrešanih oseb neposredno po nesreči (letalske nesreče, teroristični napad na Svetovni trgovinski center,..), so za genetske preiskave najprimernejši referenčni oziroma primerjalni vzorci osebni predmeti (zobne ščetke, glavniki, brivniki,..), ki jih najdemo v domovih pogrešanih oseb. Tovrstni vzorci nam namreč omogočajo neposredno primerjavo genetskih profilov v smislu iskanja identičnosti, kar je, zaradi majhnega števila referenčnih vzorcev, iz ekonomskega vidika najbolj racionalen pristop. Pri zastarelih masovnih katastrofah (množična domobranska grobišča iz časa 2. svetovne vojne v Sloveniji, množična grobišča v BiH,..) pa osebnih predmetov pogrešanih po vrsti let več ni možno zbrati, zato nam služijo kot referenčni vzorci njihovi še živeči sorodniki (23). Najlažje določimo identiteto pogrešanega oziroma žrtve, če imamo na voljo primerjalne vzorce bližnjih sorodnikov. Če teh

ni, moramo za uspešno genetsko identifikacijo (pri kateri preiskujemo poleg avtosomalnih področij STR še področja STR, vezane na kromosom Y in mtDNA), zbrati čim večje število sorodnikov pogrešane osebe (za primerjavo kromosoma Y sorodnike po očetovi liniji, za primerjavo mtDNA pa sorodnike po materini liniji), kar močno poveča stroške tovrstnih preiskav.

Velikokrat se uporablja jedrne polimorfizme za identifikacijo žrtev množičnih nesreč, kot so naravne katastrofe (potresi, poplave, požari, tsunamiji), letalske in železniške nesreče ter teroristični napadi (24 - 30). Tako so Olaisen in njegovi sodelavci (25) identificirali 139 od skupno 141 ruskih in ukrajinskih žrtev letalske nesreče, ki se je zgodila avgusta 1996 v Spitsbergnu. Uspešnost identifikacije s pomočjo analize DNA je v celoti odvisna od razpoložljivosti referenčnih vzorcev. Le dve žrtvi nista imeli bližnjih sorodnikov, zato jih s tipizacijo DNA niso mogli identificirati, pri vseh ostalih žrtvah pa je bila identifikacija uspešna. Genetske profile, ki so jih dobili iz močno poškodovanih delov teles, so primerjali z genetskimi profili bližnjih sorodnikov. Najprimernejši referenčni vzorci so matere, očetje ali otroci žrtev, saj imajo na posameznem področju STR vsaj en skupni alel. Če so bile na razpolago le sestre ali bratje, so kot referenčne vzorce uporabili več bratov in/ali sester. Pri letalski nesreči v Spitsbergnu je bila tipizacija DNA primarna identifikacijska metoda. Zaradi izredno visokega odstotka uspešnih identifikacij (98,6 %), hitrih analiz (identifikacijo žrtev so zaključili 20 dni po nesreči) in razmeroma nizke cene (3 do 5 % cene celotne operacije) se je izkazala kot izredno primerna identifikacijska metoda pri množičnih katastrofah (25). S preiskavo jedrne DNA poteka identifikacija žrtev množičnih pobojev na ozemlju bivše Jugoslavije (31, 32). Prav tako pa je s tipizacijo jedrne DNA Jeffreys s sod. (33) identificiral Josefa Mengeleja (referenčni osebi sta bila sin in žena).

Identifikacija celične populacije po transplantaciji kostnega mozga ali drugih krvotvornih matičnih celic ter določanje zigotnosti pri dvojčkih

Določanje izvora posttransplantacijske celične populacije po transplantaciji kostnega mozga je pomembno za kontroliranje uspešnosti vcepitve. Pacienta in darovalca transplantata tipiziramo pred transplantacijo (določimo genetske profile na področjih STR), po transplantaciji pa pri pacientu v določenih časovnih intervalih preverjamo razmerje med pacientovimi in darovalčevimi populacijami levkocitov. Uspešnost transplantacije potrdimo, ko se v pacientovi krvi pojavi genetski profil darovalca. Z ugotavljanjem razmerja med

genetskim profilom pacienta in darovalca lahko določimo stopnjo vcepitve transplantata. Tovrstna informacija je zelo uporabna v zgodnji posttransplantacijski fazi, saj omogoča izvedbo datatnega zdravljenja, ki prepreči neuspešno transplantacijo oziroma ponoven pojav bolezni (34). Določanje zgotnosti pri dvojčkih je pomembno v primerih potrebe po transplantaciji določenega tkiva ali organa. V primeru popolnega ujemanja genetskih profilov smo tipizirali enojajčna dvojčka.

Identifikacijski testi

Avtosomalna področja STR so poleg preverjanja sorodstvenih odnosov izredno uporabna za identifikacijske teste, pri katerih ne spremljamo načina dedovanja, ampak nas zanima, ali se genetski profili analiziranih vzorcev med seboj ujemajo. Najpogosteje jih opravljamo v kriminalističnih primerih kot so umori, posilstva, ropi, pretepi, rekonstrukcije prometnih nesreč in iskanje sledi voznika in podobno. Osumljenčev genetski profil primerjamo z genetskimi profili bioloških sledi, najdenih na kraju kaznivega dejanja. Da lahko potrdimo vpletenost osumljenca v kaznivo dejanje, se mora njegov genetski profil popolnoma ujemati z genetskim profilom biološke sledi (35 - 37). Enak princip velja za identifikacijo delov trupel po množičnih katastrofah. Deli trupla, ki imajo enak genetski profil, pripadajo isti osebi. Na podoben način opravimo tudi identifikacijo tkivnih vzorcev, odvzetih pri raznih biopsijah, kadar obstoja možnost zamenjave vzorcev (genetski profil biopsijskega vzorca primerjamo z genetskim profilom pacienta). Tipizacijo DNA uporabimo tudi za preverjanje identitete bioloških vzorcev, odvzetih za alkoholimetrične ali toksikološke preiskave v primerih, ko se preiskovanci z rezultati preiskav ne strinjajo in izrazijo dvom o istovetnosti preiskovanega biološkega vzorca. Na osnovi ponovnega odvzema telesnih tekočin (krvi, sline) preiskovancu in pridobitvi DNA iz preiskovančevih bioloških vzorcev in arhiviranega vzorca, opravimo tipizacijo avtosomalne jedrne DNA in pridobljene genetske profile med seboj primerjamo.

Opravljene tipizaciji področij STR sledi interpretacija rezultatov oziroma ocena moči genetskega dokaza. Če se genetski profil osumljenca (ali pacienta ali preiskovanca) in genetski profil biološke sledi (ali spornega tkivnega vzorca ali arhiviranega vzorca za alkoholimetrične oziroma toksikološke preiskave) ujemata, nas zanima, kakšna je verjetnost, da imata oba genetska profila isti izvor, oziroma, kakšna je verjetnost, da ima naključno izbrana oseba iz slovenske populacije enak genetski profil kot biološka sled, ali kakšna je verjetnost, da je ujemanje osumljenčevega profila in profila biološke sledi naključno. Na ta

vprašanja nam daje odgovore verjetnostna teorija. Verjetnost izračunamo empirično in temelji na populacijskih podatkih. Za oceno moči genetskega dokaza potrebujemo za vsako področje STR opravljeno populacijsko študijo na slovenski populaciji, z izračunanimi alelnimi frekvencami ter preverjeno neodvisnostjo genetskih podatkov znotraj posameznega področja in med področji STR (1, 2, 11). Če je populacijski vzorec velik, bo empirično določena verjetnost oziroma frekvenca določenega genetskega profila zelo dober približek "resnični" frekvenci. Pri izračunavanju frekvence genetskega profila v populaciji uporabljamo "pravilo produkta", ki ga podaja verjetnost kombiniranih dogodkov. Če so dogodki neodvisni, je skupna verjetnost, da se vsi zgodijo skupaj, produkt verjetnosti posameznih dogodkov. V forenziki predstavljajo dogodke posamezna področja STR. Ker morajo biti dogodki naključni in med seboj neodvisni, morajo biti področja STR, ki genetski profil tvorijo, v HW-ravnotežju in se ne smejo dedovati vezano (ležati morajo na različnih kromosomih ali čim dlje narazen na istem kromosomu). Frekvenco genotipa na enem področju STR ocenimo kot produkt alelnih frekvenc (za homozigota je ta frekvenca p^2 , za heterozigota pa $2pq$). Skupno frekvenco genetskega profila na vseh analiziranih področjih STR pa ocenimo kot produkt frekvenc genotipov posameznih področij. Frekvenca genetskega profila predstavlja verjetnost, s katero pride v populaciji do naključnega ujemanja dveh profilov sorodstveno nepovezanih oseb. Frekvenca je majhna, če je v profil vključenih veliko področij STR (pri tipizaciji 15 področij STR približno 10^{-15}). Ujemanje dveh genetskih profilov statistično ovrednotimo z verjetnostnim razmerjem, ki ga označimo s kratico LR (angl. Likelihood Ratio) in je obratno sorazmerno frekvenci genetskega profila: $LR = 1 / \text{frekvenca genetskega profila}$ (2). Pri izračunu verjetnostnega razmerja primerjamo verjetnost dogodka, da pripada biološka sled osumljencu (števec) in verjetnost dogodka, da pripada biološka sled naključno izbrani osebi iz slovenske populacije (imenovalec). Verjetnost v števcu je 1, verjetnost v imenovalcu pa je enaka frekvenci genetskega profila. Verjetnostno razmerje nam pove, kolikokrat bolj verjetno je, da pripada biološka sled osumljencu kot da pripada naključno izbrani osebi iz slovenske populacije. Izračunamo ga s pomočjo statističnega programa "DNA VIEW" v.37.15 (2015), avtorja C. H. Brennerja (38).

Avtosomalna področja STR so zaradi rekombinacije v molekularno genetskih genealoških študijah pri primerjavi z daljnimi sorodniki manj uporabna. Za preučevanje rodovnikov z genetskimi metodami so uporabna področja STR, vezana na kromosom Y, ki nam omogočajo sledenje očetovi liniji, in preiskave mitohondrijske DNA, s katero lahko sledimo materini

liniji. Ker biološko materinstvo za razliko od biološkega očetovstva najpogosteje ni sporno, so vsekakor rezultati, ki jih dobimo s preiskavo mtDNA, bolj zanesljivi od rezultatov preučevanja kromosoma Y. Verjetnost, da je nekje v predniški očetovi liniji prišlo do nebiološkega očetovstva, zaradi nezvestobe, posilstev ali posvojitve, je v ZDA približno 5 %. Ni veliko, vendar bi lahko po 10 generacijah verjetnost, da bi v krvni liniji prišlo do dogodka, ki ga genetiki imenujemo nebiološko očetovstvo, preseгла 50 %.

Kromosom Y

V sodnomoedicinskih in kriminalističnih preiskavah se je začela širša uporaba področij STR, vezanih na kromosom Y, leta 1996. Kromosom Y je haploiden in se deduje po očetu, kar nam omogoča sledenje očetovi liniji. To pomeni, da lahko v preiskave vključimo le moške, saj ženske kromosoma Y nimamo. Kromosom Y nima kromosomskega partnerja, s katerim bi se pri mejozi rekombiniral (izjema sta dve majhni psevdosomalni področji, ki se rekombinirata s kromosomom X), zato se prenaša v identični obliki iz očeta na sina. Edine spremembe na kromosomu Y povzročajo redke mutacije. Ko pride do mutacije, se zaradi odsotnosti rekombinacije le-ta ohrani in prenese na naslednjo generacijo. Zato vsebuje vsak kromosom Y zapis vseh mutacijskih dogodkov, do katerih je prišlo na Y kromosomih prednikov mnogo let nazaj. Kadar preučujemo rodovnike znotraj 8 do 9 generacij, je mutacijska stopnja kromosoma Y zelo nizka ($1.9-5.4 \times 10^{-9}$ na nukleotid/leto) (39).

Kromosom Y nam omogoča reševanje t.i. pomanjkljivih spornih očetovstev, kjer biološki material domnevnega očeta ni na razpolago za analizo, namesto njega pa lahko testiramo njegove moške sorodnike, katerih kromosom Y je identičen (očeta, dedka, brate, strice). Žal pa lahko na ta način preverjamo sporna očetovstva le v primerih, ko je otrok moškega spola. Če se Y-haplotipi testiranih očetovih sorodnikov po očetovi strani razlikujejo od otrokovega haplotipa, govorimo o izključitvi. Pri tem je dobro preveriti, ali ni prišlo do izključitve očetovstva že v eni od prejšnjih generacij. Kromosom Y nam služi kot zelo koristen dodaten sistem pri identifikaciji žrtev množičnih pobojev ob koncu 2. svetovne vojne v Sloveniji, saj lahko v preiskavo vključimo tudi daljne sorodnike po očetovi liniji, hkrati pa lahko s pomočjo kromosoma Y pri bližnjih sorodnikih - npr. bratih povečamo izračunano statistično verjetnost sorodstva med žrtvijo in še živečim sorodnikom (40).

Diskriminacijska moč Y-specifičnega identifikacijskega sistema je bistveno nižja od avtosomalnega sistema, ki nam daje edinstven genetski zapis. Y-specifičen sistem nam da haplotip, ki je identičen vsem moškim sorodnikom po očetovi liniji (očetu, dedku, bratom, stricem). S tipizacijo mikrosatelitov kromosoma Y torej lahko identificiramo le paternalno (očetovo ali moško) linijo, medtem ko nam mikrosateliti jedrne avtosomalne DNA omogočajo individualizacijo posameznika. Če primerjamo diskriminacijsko moč (moč razlikovanja med nesorodnimi osebami) sistema Y-STR z jedrno avtosomalno DNA vidimo, da je stopnja identifikacije posameznika z jedrno avtosomalno DNA praktično 100 % (običajno večja kot 99,9999 %), stopnja identifikacije paternalne linije s tipizacijo mikrosatelitov kromosoma Y pa je približno 99 % (98,8 %). Sistem, pri katerem analiziramo 17 Y-STR področij, nam namreč daje informativno vrednost haplotipov, ki znaša 98,8 %, kar pomeni, da je v slovenski populaciji verjetnost naključnega ujemanja haplotipov kromosoma Y med sorodstveno nepovezanimi osebami 1,2 % (3). Zato je sistem Y-specifičnih označevalcev, če ga uporabimo kot samostojni test, uporaben za izključitve. V kombinaciji z avtosomalnimi STR-označevalci nam omogoča pri potrditvah očetovstva ali drugih sorodstvenih povezavah povečanje statistične verjetnosti sorodstva, pri čemer določimo frekvenco haplotipa kromosoma Y s pomočjo podatkovne zbirke YHRD - Y chromosome haplotype reference database (41).

Spolna kromosoma X in Y nam omogočata določanje spola forenzičnega vzorca, tako v kriminalističnih kot v genealoških in sodnomoedicinskih primerih, kjer imamo opravka s skeletiziranimi posmrtnimi ostanki ali neprepoznavnimi trupli. Test za določanje spola temelji na pomnoževanju kratkega odseka introna 1 amelogeninskega gena na kromosomu X in Y in ga je opisal Sullivan s sodelavci (42). Amelogenin je protein, ki sodeluje pri razvoju skleninskega matriksa zobne pulpe pri sesalcih. Za razliko od področij STR amelogeninski gen ne predstavlja ponavljajočega se nukleotidnega zaporedja (43). Med homolognimi geni kromosoma X in Y je amelogeninski gen najprimernejši za določanje spola. Po PCR-reakciji, pri kateri uporabimo en par oligonukleotidnih začetnikov, dobimo X- in Y-specifične produkte, ki se med seboj razlikujejo po dolžini. Na pomnoženem intronskem odseku je namreč med kromosomom X in Y prisotna dolžinska razlika. Na kromosomu X je v evoluciji prišlo do delecije 6 baznih parov, zato dobimo krajši amplifikacijski produkt kot na kromosomu Y. Pri pomnoževanju ženske DNA (XX) dobimo produkta istih dolžin, pri pomnoževanju moške DNA (XY) pa produkta dveh različnih dolžin, ki se med seboj razlikujeta za 6 baznih parov. Ker so produkti pomnoževanja odseka amelogeninskega gena zelo kratki, lahko določamo spol tudi za močno razgrajene vzorce (44). Odsek

amelogeninskega gena pomnožujemo v hkratni PCR-reakciji skupaj z področji STR, kar nam omogoča poleg ugotavljanja identitete tudi določanje spola. Kombinacija obeh informacij je zelo uporabna pri analizi kriminalističnih vzorcev (42).

Ker se kromosom Y in priimki v Zahodni civilizaciji dedujejo po moški liniji, lahko sledimo prednikom po pisnih virih (priimki in kraj izvora) in te izsledke primerjamo s preiskavami kromosoma Y še živečih domnevnih potomcev po paternalni liniji. Pri preučevanju paternalnih rodovnikov preko priimkov ljudi predvsem zanima, ali je nek moški, ki so ga odkrili v pisnih virih in je prišel npr. iz Evrope v ZDA sredi 18. stoletja, njihov prednik. Kot primerjalni vzorci so uporabni moški, ki živijo v bližini kraja, od koder je priseljence pripotoval v Ameriko in imajo enak priimek. Genetska analiza vključuje približno 17 Y-STR področij. Če se moška, ki iščeta skupnega prednika, razlikujeta na treh ali več področjih STR, nista sorodna (s tem upoštevamo možnost mutacijskega dogodka), v nasprotnem primeru pa imata skupnega prednika in sta daljna sorodnika.

Kromosom Y so za razjasnitev očetovstva analizirali v nekaterih zelo znanih in polemičnih genealoških študijah. Tako so dokazali, da je bil tretji ameriški predsednik Thomas Jefferson oče najmanj enega od sedmih sinov svoje sužnje Sally, o čemer se je v ameriški črnski skupnosti govorilo že od 19. stoletja, vendar so beli zgodovinarji, v skrbi za moralni lik Jeffersona, to vztrajno zavračali. Kot primerjalne vzorce za Thomasa Jeffersona in sinove sužnje Sally so uporabili njihove še živeče potomce po moški liniji. Po pregledovanju rodovnikov so za Thomasa Jeffersona našli še živeče potomce po njegovem stricu (po očetovi strani), še živeče potomce pa sta imela tudi prvi in zadnji sin sužnje Sally. Za zadnjega sina so dokazali identičnost haplotipov kromosoma Y s potomci Thomasa Jeffersona (45).

PREISKAVE MITOHONDRIJSKE DNA

Kadar analiza jedrne DNA (tako avtosomalne kot DNA, vezane na kromosom Y) zaradi premajhne količine genetskega materiala ali njegove razgrajenosti ni uspešna, se poslužujemo polimorfizmov mtDNA, ki jih od leta 1992 uporabljamo v forenzičnih preiskavah. Posamezna človeška celica vsebuje številne kopije mtDNA, kar daje, v primerjavi z le dvema kopijama avtosomalnih kromosomov, veliko večjo možnost izolacije mtDNA iz slabo ohranjenih bioloških vzorcev kot so telogeni lasje, stare kosti, zobje, feces, urin in nohti (46). V metabolno aktivnih celicah najdemo 1000 do 10.000 molekul mtDNA. Krožna oblika in

mitohondrijska ovojnica ščitita mtDNA pred razgradnjo z eksonukleaznimi encimi, zato je mtDNA manj podvržena razgradnji kot jedrna DNA (47). To še dodatno poveča možnost uspešne analize degradiranih vzorcev z mtDNA. Mitohondriji se nahajajo v citoplazmi, zato se mtDNA deduje neodvisno od jedrnega genoma. Za gene, ki se nahajajo zunaj jedra, je značilno citoplazmatsko dedovanje, katerega skrajni primer je dedovanje po enem staršu, večinoma po materi. Mitohondrijska DNA se pri človeku deduje po materi in se za razliko od kromosoma Y prenese na vse njene potomce ne glede na spol, kar nam omogoča sledenje materini liniji. Zaradi maternalnega dedovanja obravnavamo nukleotidno zaporedje mtDNA kot enolokusno ali haplotipsko (48). Zaradi odsotnosti rekombinacije in dedovanja po materi imajo osebkovi z enakimi zaporedji nukleotidov mtDNA skupnega ženskega prednika. To je osnova za identifikacijo bioloških vzorcev s pomočjo analize mtDNA. Za razliko od kromosoma Y, ima mtDNA nekoliko višjo mutacijsko stopnjo (3.5×10^{-8} na nukleotid/leto) (49).

Mitohondrijska DNA predstavlja pri človeku 0,3 % genomske DNA. Je mala, dvovertična, kovalentno zaprta krožna molekula, ki jo sestavljata zunanja težka veriga (veriga H) in notranja lahka veriga (veriga L). MtDNA je dolga 16.569 bp in ima v celoti določeno nukleotidno zaporedje (50). Z vidika forenzičnih molekularno genetskih preiskav je zaradi izredne polimorfности zanimiva zlasti nekodirajoča kontrolna regija mtDNA. V kodirajočih področjih pa so zanimive točkovne mutacije, ki jih imenujemo enonukleotidni polimorfizmi in označimo s kratico SNP (angl. Single Nucleotide Polymorphism). Ti nam omogočajo povečanje diskriminacijske in izključitvene moči molekularno genetskih identifikacij s tipizacijo mtDNA (51). Variabilno kontrolno regijo mtDNA imenujemo tudi D-zanka. Znotraj te zanke sta najbolj variabilni hipervariabilni področji 1 in 2 (HVI in HVII), od katerih je vsaka dolga približno 400 bp. HVI ima večje število sekvenčno variabilnih mest in nižjo frekvenco posameznih polimorfizmov, HVII pa manjše število sekvenčnih polimorfizmov, ki imajo višjo frekvenco (52). Identifikacije s pomočjo mtDNA temeljijo na sekvenčnem polimorfizmu teh dveh področij. Evropski kavkazijci se med seboj razlikujemo na obeh področjih povprečno na 8 nukleotidnih pozicijah, kar predstavlja približno 1,5 % nukleotidno raznolikost, medtem ko se Afričani med seboj razlikujemo na obeh področjih povprečno kar na 14 nukleotidnih pozicijah (53). Raznolikost mtDNA je 5- do 10-krat višja med rasami kot znotraj posameznih ras, ki so med seboj precej podobne (54). Raznolikost znotraj črnske rase je veliko večja kot znotraj azijske, belske in hispanske rase (55), po variabilnosti pa črnski rasi sledi azijska rasa (56). Zaradi velike variabilnosti mtDNA znotraj in med populacijami lahko

s polimorfizmi mtDNA ugotavljamo genetsko strukturo populacij, filogenetske odnose med njimi ter migracije in poselitev sveta z modernim človekom.

Analizo sekvenčnega polimorfizma mtDNA uporabljamo za identifikacijske teste in za določanje maternalnih rodovnikov, ni pa primerna za preverjanje spornih očetovstev, saj se deduje le po materi. Primerna je za reševanje detomorov, pri katerih se morata mtDNA domnevne matere in najdenih posmrtnih ostankov novorojenca popolnoma ujemati. MtDNA nam služi kot zelo koristen dodaten sistem pri identifikaciji žrtev množičnih pobojev ob koncu 2. svetovne vojne v Sloveniji, saj lahko v preiskavo vključimo tudi daljne sorodnike po materini liniji, hkrati pa lahko s pomočjo mtDNA pri bližnjih sorodnikih - npr. bratih in sestrah povečamo izračunano statistično verjetnost sorodstva med žrtvijo in še živečim sorodnikom (57), pri čemer določimo frekvenco haplotipa mtDNA s pomočjo podatkovne zbirke EMPOP - European mtDNA database (58).

Mitohondrijski genom je zelo uporaben za določanje identitete starih posmrtnih ostankov ter preučevanje genealoških odnosov, saj lahko kot referenčni vzorec uporabimo tudi nekaj generacij oddaljene sorodnike po materini liniji (59). Z genetskimi preiskavami so znanstveniki odgovorili na eno najvznemirljivejših ugank francoske zgodovine. S tipizacijo mtDNA so identificirali francoskega prestolonaslednika Ludvika XVII. (Slika 2), katerega srce je po usmrtitvi izrezal zdravnik in se je ohranilo vse do danes. Iz preko 200 let starega srca pridobljen haplotip mtDNA so primerjali s haplotipom mtDNA las Marije Antoinette in njenih še živečih potomcev po materini liniji. Z identičnostjo haplotipov so dokazali, da je bil desetletni deček, ki je leta 1795 umrl v ječi Temple, res sin Ludvika XVI. in Marije Antoinette (60, 61). Ta ugotovitev je ovrгла vse romantične zgodbe o tem, da so princa Ludvika z zamenjavo z drugim otrokom, neznanci rešili iz ječe in zgodbe vseh 43 avanturistov, ki so se v 19. stoletju razglašali za Ludvika XVII, med katerimi je bil najprepričlivejši pruski urar Naundorff. Tudi iz njegovih posmrtnih ostankov so izolirali mtDNA in jo primerjali z mtDNA las Marije Antoinette in mtDNA dveh njenih še živečih sorodnikov po materini liniji. Neujemanje mitohondrijskih sekvenc potrjuje, da Naundorff ni bil sin Marije Antoinette.



Slika 2: Identifikacija Ludvika XVII. (z leve proti desni: Ludvik XVI., Ludvik XVII. in Marija Antoinetta).

S pomočjo polimorfizmov mtDNA in primerjavo s še živečimi sorodniki po materini liniji so identificirali tudi skeletne ostanke Martina Bormanna, enega najbolj radikalnih Hitlerjevih sodelavcev (62), in skeletne ostanke Jesse Jamesa, stare več kot 115 let (63). Molekularno genetske analize 400 let starih skeletnih ostankov princa Branciforte Barresija iz Sicilije (64), 5000 let starega tirolskega ledenega človeka - Oetzija (65, 66), neandertalca (67), najdenega v zahodni Nemčiji, in mnoge druge molekularno genetske analize starodavnih antropoloških bioloških materialov so pokazale, da je možno pridobiti mtDNA iz zelo starih človeških ostankov. MtDNA so izolirali iz človeških skeletov in mumificiranih mehkih tkiv različnih muzejskih in arheoloških zbirk, pri egipčanskih mumijah je bila uspešna tudi ekstrakcija jedrne DNA (68). Prav tako so uspešno izolirali mtDNA 40.000 let starega mamuta, najdenega v Sibiriji, in potrdili njegovo sekvenčno sorodnost z današnjim slonom. Najstarejšo uspešno izolacijo DNA pa predstavlja DNA iz kloroplastov 17-20 milijonov let starih fosiliziranih listov magnolije. Avtentičnost te DNA je potrdila natančna primerjava fragmentov DNA z moderno magnolijo (69).

Stopnja identifikacije, ki jo dosegamo s preiskavo mtDNA, je zaradi odsotnosti rekombinacije veliko nižja od stopnje identifikacije, ki jo dosegamo s preiskavo jedrne avtosomalne DNA. S tipizacijo mtDNA lahko identificiramo le maternalno (materino ali žensko) linijo, medtem ko nam mikrosateliti jedrne avtosomalne DNA omogočajo individualizacijo posameznika. Če primerjamo diskriminacijsko moč (moč razlikovanja med nesorodnimi osebami) mtDNA z jedrno avtosomalno DNA vidimo, da je stopnja identifikacije posameznika z jedrno avtosomalno DNA praktično 100 % (običajno večja kot 99,9999 %), stopnja identifikacije maternalne linije s tipizacijo področij HVI in HVII mtDNA pa je 98,8 %, kar pomeni, da je v

slovenski populaciji verjetnost naključnega ujemanja haplotipov mtDNA med sorodstveno nepovezanimi osebami 1,2 % (5).

Veliko molekularno genetskih identifikacij je opravljenih s preiskavo več različnih genetskih označevalcev (avtosomalni mikrosateliti, mikrosateliti vezani na kromosom Y in mtDNA). Tako so s tipizacijo jedrne in mtDNA identificirali zob nemškega cesarja Kaiserja Wilhelma II. (70), brata Reinholda Messnerja (71) in slavnega astronoma Nikolaja Kopernika (72) ter preverjali sorodstveno povezanost skeletov, ki datirajo v 7. stoletje (73). Z jedrno in mtDNA so identificirali leta 1960 pokopane člane gverilske organizacije Che Guevara v Boliviji (74) in 50 let stare skeletne ostanke pilota Jamesa B. McGoverna (75). S preiskavo jedrne in mtDNA poteka identifikacija skeletnih ostankov ameriških vojakov, padlih v vojnah v Vietnamu, Kambodži, Laosu in na Kitajskem, v korejski vojni, v I. in II. svetovni vojni (76 - 79) ter identifikacija domobranskih žrtev v Sloveniji (9, 10). Ena najbolj odmevnih molekularno genetskih identifikacij skeletnih ostankov, kjer je bilo možno tipizirati več genetskih označevalcev, je bila prav gotovo identifikacija ruske vladarske družine Romanov (80 - 83), pri kateri je bilo potrebno za pozitivno identifikacijo analizirati tako jedrno kot mitohondrijsko DNA. S pomočjo jedrne DNA so lahko preverili maternalno in paternalno povezanost družinskih članov v grobišču, niso pa mogli odgovoriti na vprašanje, ali gre dejansko za posmrtno ostanke družine Romanov. Jedrna DNA namreč omogoča le preverjanje bližnjih sorodstvenih odnosov, preverjanje sorodnosti med daljnimi sorodniki, ki so med seboj nekaj generacij oddaljeni, pa zaradi rekombinacije ni mogoče. Preverjanja daljnih sorodstvenih povezav je možno z analizo mtDNA, saj se ta deduje po materi in se ne rekombinira ter z analizo mikrosatelitov kromosoma Y, ki se prenaša iz očeta na sina v nespremenjeni obliki. Pri družini Romanov so preverili identičnost skeletnih ostankov tako, da so nukleotidna zaporedja mtDNA primerjali z nekaj generacij oddaljenimi, še živečimi potomci po materini liniji. Referenčna oseba za identifikacijo carice Aleksandre in njenih otrok je bil Princ Filip, vojvoda Edinburški, pranečak carice Aleksandre in mož angleške kraljice Elizabete II. Njegova mtDNA je bila identična caričini in otroškim. Še živeči referenčni osebi za identifikacijo carja Nikolaja sta bila vnuk in vnukinja Luise Hesse Cassel. Pri carju Nikolaju se sekvenca haplotipa mtDNA na eni nukleotidni poziciji ni ujemala s še živečimi sorodniki po materini liniji, zato so opravili dodatne primerjave carja Nikolaja s posmrtnimi ostanki carjevega brata Georgija Romanova, ki je umrl za tuberkulozo leta 1899 in so ga za potrebe te analize ekshumirali iz katedrale Svetega Petra in Pavla v Sankt Peterburgu ter potrdili popolno identičnost nukleotidnih zaporedij mtDNA (81). Z analizo

jedrne in mitohondrijske DNA so dokazali, da posmrtni ostanki v domnevem grobišču družine Romanov dejansko pripadajo tej družini. V grobišču so našli posmrtne ostanke carja Nikolaja II, carice Aleksandre, treh njenih otrok, treh služabnikov in družinskega zdravnika. Car in carica sta imela štiri hčerke in sina. Vsi trije najdeni otroški skeleti so bili ženskega spola. V grobišču sta torej manjkali trupli sina in ene od hčera (80). Identifikaciji Romanovih je sledila genetska preiskava biološkega materiala (biopsijski vzorec črevesnega tkiva, ki so ga odvzeli Andersonovi leta 1979 in je bil shranjen v eni od bolnišnic v Virginiji) pokojne Ane Anderson Manahan, ki je vse do svoje smrti leta 1984 v ZDA trdila, da je Anastazija Romanov. Genetska povezanost Andersonove z Romanovimi je bila ovržena (82). Pred nekaj leti pa je bila uganka Romanovih končno rešena, saj so našli manjkajoča otroška skeleta le 70 m proč od grobišča, kjer so leta 1991 izkopali posmrtne ostanke večine članov družine Romanovih. Genetska analiza je potrdila, da najdena otroška skeleta pripadata manjkajočemu sinu in eni od hčera (83).

V slovenskem prostoru so iz vidika molekularno genetskih genealoških študij izredno zanimive lobanje Celjskih grofov, ki so jih pred desetletjem analizirali v genetskem laboratoriju v Rimu, a neuspešno, in bi jih bilo vredno ponovno preučiti, saj je v zadnjem desetletju tehnologija v molekularni genetiki močno napredovala. Zaradi izredno velikega nacionalnega pomena teh lobanj je problem ponovne analize v tem, da bi zopet prišlo do popolnega uničenja dela kostnega tkiva, pri čemer pa žal zaradi velike starosti lobanj uspešnosti genetske analize vnaprej ni moč zagotoviti. Del lobanje, ki bi jo potrebovali za genetsko analizo, ne bi bil prav velik, saj smo pri preiskavah strih skeletnih ostankov razvili metodo ekstrakcije, ki omogoča pridobitev DNA že iz 0,5 g kostnega prahu (84). Grofje Celjski so bili naša najpomembnejša plemiška rodbina. Vladali so od 13. do 15. stoletja, ko se je s smrtjo Ulrika II. Celjskega njihova vladavina zaključila. Vse družinske člane od Friderika I. naprej so pokopavali v družinsko grobnico v minoritski cerkvi v Celju. Po požaru leta 1811 so le lobanje brez spodnjih čeljustnic spravili v cerkvi za glavni oltar ter jih po 2. svetovni vojni prenesli v Celjski pokrajinski muzej. Celjski grofje imajo po Barbari Celjski (ženska linija) še živeče potomce (ohranili so se od 15. stoletja v neprekinjeni liniji dvajsetih generacij). Zato bi bila z analizo mtDNA možna natančna identifikacija lobanj, študija pa bi bila podobna že omenjeni identifikaciji Romanovih, le da v primeru Celjskih najverjetneje jedrne DNA ne bi bilo možno analizirati, saj so lobanje bistveno starejše od posmrtnih ostankov ruske vladarske družine (500 let v primerjavi z 90 leti).

MOLEKULARNO GENETSKE IDENTIFIKACIJE ŽRTEV POVOJNIH MNOŽIČNIH POBOJEV V SLOVENIJI

V Sloveniji je evidentiranih približno 600 množičnih grobišč iz časa med in po drugi svetovni vojni. Po oceni zgodovinarja Jožeta Dežmana je žrtev množičnih pobojev na slovenskih tleh okoli 100.000. V Sloveniji smo pri desetih grobiščih opravili molekularno genetsko identifikacijo. To so grobišča, za katera so v glavnem bili na razpolago poimenski sezname žrtev, na osnovi katerih smo lahko zbrali primerjalne vzorce ustnih sluznic še živečih sorodnikov. Za nadaljnje genetske preiskave je zelo pomembno zbiranje in shranjevanje posmrtnih ostankov, zato je zelo pomemben pravilen postopek izkopa in shranjevanja posmrtnih ostankov, pravilen izbor kosti in zob ter dosledno upoštevanje ukrepov za preprečevanje kontaminacije endogene DNA.

Največje grobišče, ki smo ga molekularno genetsko obdelali, je grobišče Konfin I, iz katerega so leta 2006 izkopali skeletne ostanke 88 žrtev, za katere smo uspeli pridobiti brise ustnih sluznic še živečih bližnjih in daljnih sorodnikov za 44 žrtev. Za preiskave smo uporabili stegenice, katerih genetske profile smo primerjali s še živečimi sorodniki. Pred pričetkom molekularno genetskih preiskav smo z namenom sledljivosti v primeru pojava kontaminacije pripravili eliminacijsko podatkovno zbirko, ki je vsebovala genetske profile vseh oseb, ki smo bile kakorkoli v stiku s skeletnimi ostanki med izkopom, shranjevanjem vzorcev ter antropološko in genetsko študijo. Kosti smo očistili, odstranili površinsko kontaminacijo in zmleli v prah ter genomsko DNA izolirali v napravi Biorobot EZ1 (Qiagen), s predhodno dekalifikacijo. Jedrno DNA vzorcev smo kvantificirali z metodo kvantitativne reakcije PCR v realnem času in pridobili do 100 ng DNA/g kosti. Avtosomalno jedrno DNA, kromosom Y in mtDNA smo tipizirali pri kosteh, pri referenčnih osebah - še živečih sorodnikih smo tipizirali avtosomalno jedrno DNA, za sorodnike po materini liniji je bilo potrebno pridobiti tudi haplotipe mtDNA, za sorodnike po očetovi liniji pa tudi haplotipe kromosoma Y. Pri osebah za eliminacijsko podatkovno zbirko smo poleg avtosomalne jedrne DNA tipizirali še mtDNA ter pri moških osebah mikrosatelite kromosoma Y. Ob primerjavi genetskih profilov kosti s še živečimi sorodniki smo pri 32 kosteh zasledili ujemanje z referenčnimi osebami (sestrami, brati, hčerkami, sinovi, bratranci in nečaki) ter statistično ovrednotili verjetnosti sorodstvenih povezav. Verjetnost sorodstva, ki presega vrednost 99,9 %, zadostuje za pozitivno identifikacijo. Pri vseh 32 žrtvah poboja so izračunane verjetnosti sorodstva precej visoke in govorijo v prid pozitivni identifikaciji. Tako se naknadne verjetnosti sorodstva

gibajo med 99,9 % in več kot 99,999999 %. Dokazali smo, da je ob preiskavi večjega števila genetskih označevalcev (avtosomalni mikrosateliti, mikrosateliti kromosoma Y in kontrolna regija mtDNA) in vključitvi tako bližnjih kot daljnih sorodnikov žrtev v analizo, možno pozitivno identificirati žrtve druge svetovne vojne, za katere je zaradi časovne oddaljenosti težko pridobiti še živeče bližnje sorodnike. Molekularno genetsko identifikacijo žrtev grobišča Konfin I smo objavili v najuglednejši svetovni forenzični reviji *International Journal of Legal Medicine* (10).

PRIHODNOST FORENZIČNIH GENETSKIH PREISKAV

Naj zaključim s pogledom v prihodnost forenzičnih genetskih preiskav. Današnje preiskave jedrne DNA in mtDNA, ki temeljijo na analizi nevtralnih odsekov, ne nosijo nobene informacije o vidnih karakteristikah posameznika (barva oči, las, kože, telesna višina,..) in nam omogočajo le ugotavljanje identitete. Edino vidno karakteristiko, ki jo lahko določimo, je spol. Prihodnost genetskih preiskav v forenziki pa je prav gotovo v tem, da bi lahko poleg individualizacije neke sledi iz nje z določeno zanesljivostjo razbrali tudi fizične karakteristike oziroma vidne lastnosti posameznika. Novejše razisklave nam nakazujejo možnosti ugotavljanja vidnih znakov posameznika iz bioloških sledov v bodočnosti. Pri genu za receptor melanokortin 1 so nekatere mutacije povezane s fenotipom rdeče barve las, kar pomeni, da so določeni polimorfizmi indikatorji za rdečo barvo las (85). Znotraj genov, ki so povezani s pigmentacijo pri človeku so odkrili enonukleotidne polimorfizme, s pomočjo katerih lahko z določeno zanesljivostjo (ki pa ni 100-odstotna) določimo barvo oči (86, 87), las in kože (87, 88). Enonukleotidne polimorfizme, s pomočjo katerih lahko napovemo etnično pripadnost, barvo oči, las in kože so preiskovali tako pri sodobnih kot pri starodavnih človeških skeletnih ostankih – npr. iz bronaste in železne dobe (89) ter pri neandertalcih (90). Najnovejše raziskave preiskujejo polimorfizme, ki nam bi z določeno natančnostjo poleg določitve barve oči, las in kože, omogočili iz bioloških sledov določitev telesne višine, kronološke starosti, morfologije las, plešavost, izziv pa so vsekakor obrazne lastnosti - morfologija. Le nekaj držav po svetu - npr. Nizozemska ima zakonodajo, ki v pravosodju eksplicitno omogoča uporabo DNA za določanje fenotipskih lastnosti, pri čemer je dovoljeno le določanje zunanjih vidnih karakteristik posameznika, ne pa tudi nagnjenosti k boleznim ali določenim vedenjskim deviacijam. V večini pravosodnih sistemov pa je trenutno še vedno dovoljeno preiskovati le nekodogena področja DNA.

Sestavek je v podobni obliki objavljen v reviji Medicinski razgledi (91). Preiskave skeletov iz grobišč druge svetovne vojne smo predstavili v monografiji z naslovom Genetic identification of Second World War victim's skeletal remains (92), ki je izšla pri nemški založbi Lap Lambert, preiskave, opravljene na starih skeletnih ostankih, ne le iz časa druge svetovne vojne, ampak tudi preko 300 let starih skeletov iz arheološkega najdišča Auerspergova kapela, pa so bile objavljene v različnih znanstvenih revijah (93-99). Preiskave bioloških sledi so objavljene v reviji Pravosodni bilten (100,101). Večino objavljenih del lahko dobite v obliki pdf na spletni strani: https://www.researchgate.net/profile/Irena_Pajnic/contributions

METODE RAZISKOVANJA DNA V FORENZIČNIH PREISKAVAH:

Izolacija genske DNA:

Za preverjanje sorodstvenih povezav (zlasti spornih očetovstev) in identifikacijo oseb iz razmeroma dobro ohranjenih bioloških materialov izoliramo gensko DNA iz naslednjih bioloških vzorcev: kri in krvni madeži, slina in sledovi slin v kriminalističnih primerih (cigaretni ogorki, poštna znamka, zobne ščetke), tkiva, odvzeta pri obdukciji, sperma in vaginalni brisi, odvzeti po posilstvu, lasje z lasno korenino, prhljaj, citološki in histološki preparati, tkiva, vpeta v parafinske bloke, epiteljske celice na prstnem odtisu (kontaktne sledi),... Iz starih bioloških materialov (skeletni ostanki, zobje), slabo ohranjenih bioloških vzorcev (v letalskih nesrečah, eksplozijah, požarih ali prometnih nesrečah zoglenela in močno poškodovana trupla), iz starega fecesa ter mikrosledov v kriminalističnih primerih (izpadli lasje, ki so običajno brez korenin) pogosto ni moč izolirati dovolj kvalitetne jedrne DNA za uspešno tipizacijo mikrosatelitskih lokusov, pričakujemo pa lahko uspešno tipizacijo mtDNA. Gensko DNA sprostimo iz celičnih in jedrnih membran ob uporabi encima proteinaze K. Sproščeno DNA prečistimo v napravi Biorobot EZ1 ob uporabi kompleta EZ1 DNA Investigator Kit (Qiagen).

Kvantifikacija mtDNA in jedrne DNA z metodo kvantitativne reakcije PCR v realnem času:

Metoda temelji na zaznavi 5'-nukleazne aktivnosti Taq DNA-polimeraze ob uporabi s fluorescentnimi barvili označenih sond in detekcijskega sistema, pri katerem spremljamo

napredovanje PCR-amplifikacije v realnem času (od cikla do cikla se količina fluorescentno označenega amplifikacijskega produkta povečuje, kar vidimo kot povečevanje fluorescentnega signala). Kvantitativno reakcijo PCR v realnem času izvajamo na aparaturi ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), s pomočjo računalniškega programa Sequence Detector Software (Applied Biosystems) pa ob uporabi predhodno narejene standardne krivulje izračunamo koncentracijo DNA naših vzorcev.

Reakcija PCR:

Izolaciji genomske DNA sledi pomnoževanje lokusov STR ali regij mtDNA v verižni reakciji s polimerazo. Reakcijo je sredi 80. let odkril Kary Mullis in za to odkritje prejel Nobelovo nagrado. Reakcija nam v približno 30 ciklih omogoča pomnožitev specifičnih regij genoma v milijon ali več kopijah, kar je pomembno zato, da lahko odsek DNA, ki nas zanima, detektiramo. Glede na tip biološkega materiala oziroma pričakovano stopnjo degradiranosti se odločimo, ali bomo opravili genotipizacijo jedrne DNA ali tipizacijo mtDNA. V prvem primeru v hkratni reakciji PCR pomnožujemo lokuse STR, v drugem primeru pa amplificiramo regijo HVI in HVII mtDNA ali regije, ki vsebujejo enonukleotidne polimorfizme mtDNA.

Čiščenje amplifikacijskih produktov:

Po končani reakciji PCR ostanejo v amplifikacijskem produktu preostali, nevgrajeni deoksinukleozidni prekursorji (dNTP) in oligonukleotidni začetniki, ki motijo nadaljnje sekvenciranje in minisekvenciranje. Zato pred sekvenčno reakcijo in minisekvenciranjem amplifikacijske produkte prečistimo z ExoSAP-IT (ta vsebuje dva hidrolitična encima, eksonukleazo I in alkalno fosfatazo, pridobljeno iz morskih rakcev). Eksonukleaza I razgradi preostale enoverižne oligonukleotidne začetnike in enoverižne produkte DNA, alkalna fosfataza pa hidrolizira preostale proste nukleotide.

Sekvenciranje mtDNA:

Z metodo avtomatskega fluorescentnega direktnega sekvenciranja obdelamo v PCR pomnožene odseke HVI in HVII. Gre za tehniko fluorescentnega označevanja in z njo povezano fluorescentno zaznavo na avtomatskem sekvenatorju 3130 Genetic Analyser

(Applied Biosystems). Pri metodi cikličnega sekvenciranja se fluorokromi v nastajajoče fragmente DNA vključujejo z uporabo na 3'-koncu označenih dideoksinukleozid-fosfatov (»big dye terminators«). Avtomatsko sekvenciranje za obe hipervariabilni regiji opravimo na lahki in na težki verigi mtDNA. Pridobljena nukleotidna zaporedja primerjamo s t.i. »Andersonovo sekvenco«, ki jo uporabljamo kot referenčno nukleotidno zaporedje pri raziskovanju polimorfizmov človeške mtDNA in je poimenovana po raziskovalcu, ki je podal nomenklaturu in prvi opisal nukleotidno zaporedje celotne mtDNA.

Minisekvenciranje mtDNA (reakcija SNaPshot):

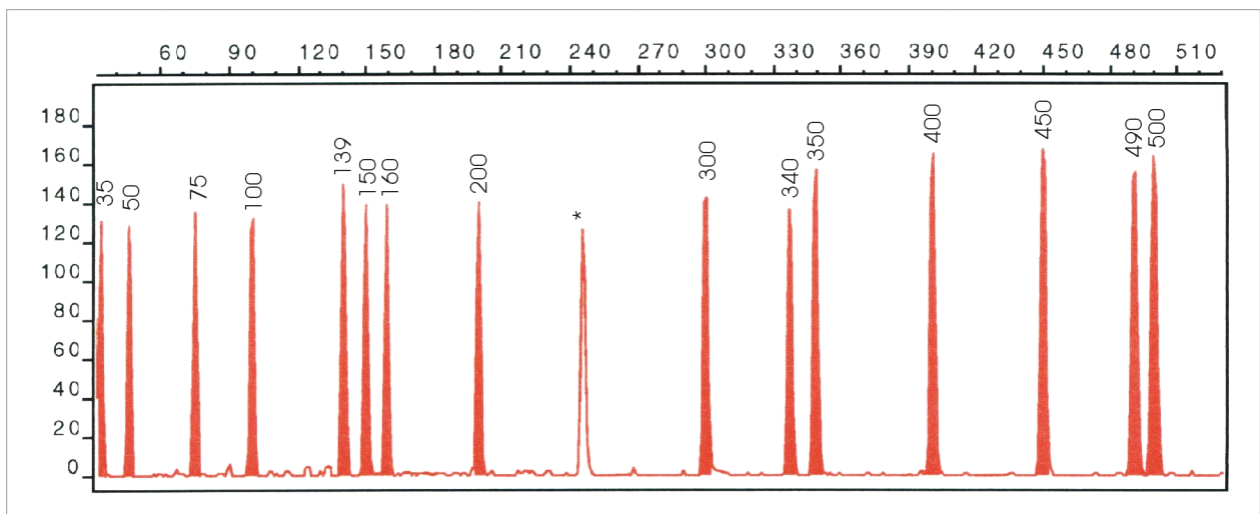
Reakcija SNaPshot je osnovana na podaljšanju neoznačenih minisekvenčnih oligonukleotidnih začetnikov za eno samo fluorescentno označeno dideoksi-bazo. Analiza enonukleotidnih polimorfizmov temelji na fluorescentni zaznavi na avtomatskem sekvenatorju 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Hkratno razlikovanje 15 ali več enonukleotidnih polimorfizmov dosežemo s kombinacijo barvne in dolžinske strategije. Označenost dideoksinukleozid-fosfatov (ddATP, ddCTP, ddGTP in ddTTP) z različnimi fluorokromi nam omogoča barvno razlikovanje polimorfizmov A/G in C/T, dolžina izbranih minisekvenčnih oligonukleotidnih začetnikov (dodatek različno dolgih nehomolognih repov) pa dolžinsko razlikovanje enonukleotidnih polimorfizmov.

Čiščenje sekvenčnih in minisekvenčnih produktov:

Po končani sekvenčni in minisekvenčni reakciji ostanejo v reakcijskem produktu nevgrajeni, s fluorokromi označeni dideoksinukleozid-fosfati, katerih hkratno potovanje s sekvenčnimi ali minisekvenčnimi produkti v kapilarni elektroforezi bi povzročilo visok signal ozadja. Zato sekvenčne in minisekvenčne produkte prečistimo z MicroSpinTM G-50 kolonami (te zadržijo nevgrajene ddNTP-je) ali z uporabo encima alkalna fosfataza, pridobljenega iz morskih rakcev (SAP), ki defosforilira fluorescentno označene nukleotide.

Analiza amplifikacijskih produktov lokusov STR in sekvenčnih ter minisekvenčnih produktov mtDNA na avtomatskem sekvenatorju 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems):

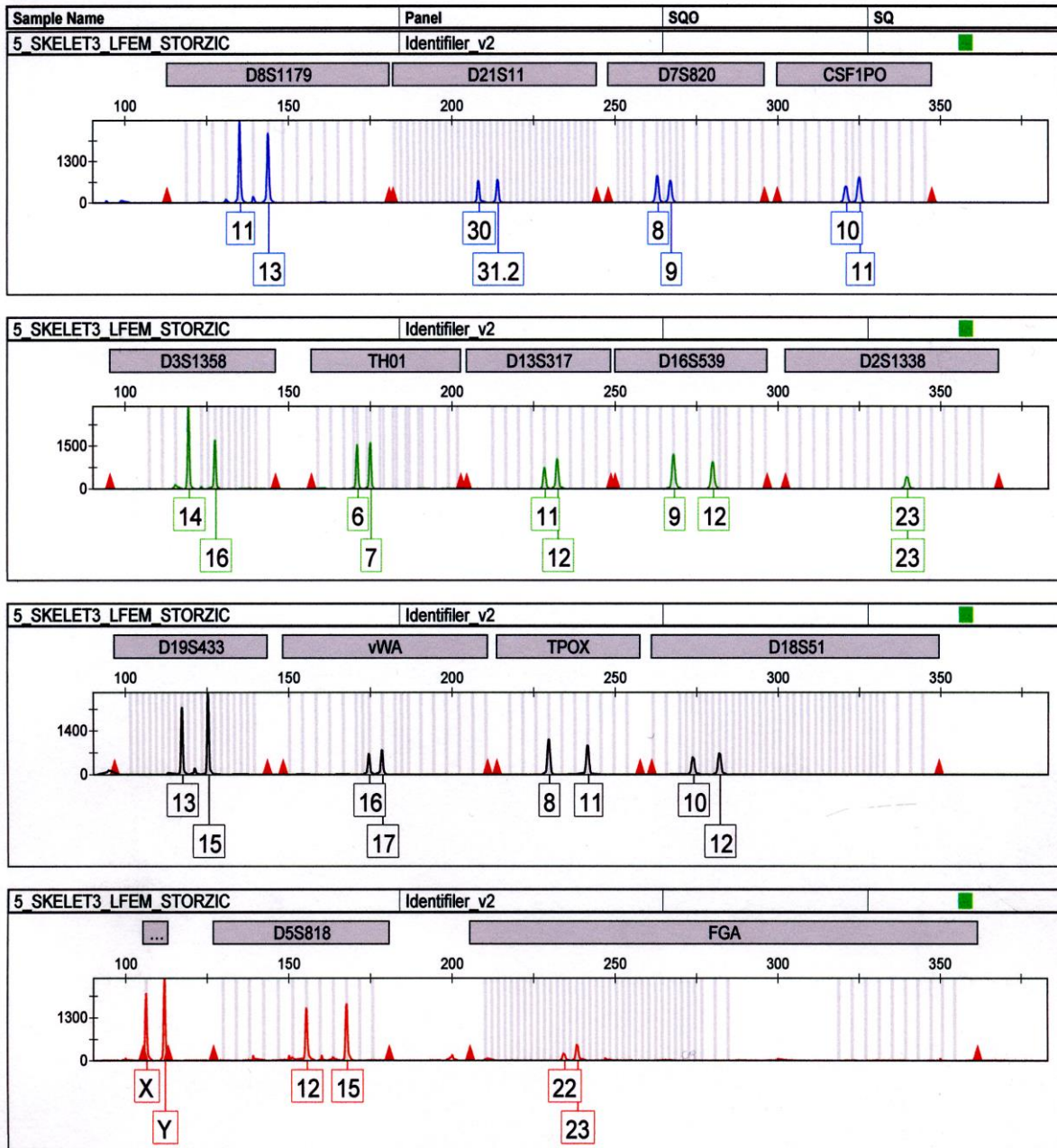
Produkte reakcije PCR, ki jih imenujemo tudi amplifikacijski produkti, ločujemo po principu kapilarne elektroforeze, pri kateri poteka ločevanje vzorcev zaporedno, injiciranje je avtomatsko, zaznava fragmentov DNA pa temelji na fluorescenci, saj dobimo po reakciji PCR fluorescentno označene produkte. Za ločevanje fluorescentno označenih amplifikacijskih produktov lokusov STR in sekvenčnih ter minisekvenčnih produktov mtDNA uporabimo avtomatski genski analizator ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems) ki nam omogoča natančno ločevanje fragmentov DNA. Pri analizi mikrosatelitskih lokusov jedrne DNA hkrati detektiramo štiri, z različnimi fluorokromi označene amplifikacijske produkte, s petim fluorokromom pa je označen notranji velikostni standard. Ker poteka ločevanje notranjega velikostnega standarda pri popolnoma enakih elektroforetskih pogojih kot ločevanje amplifikacijskih produktov, nam služi za avtomatsko določanje dolžin alelov v baznih parih. Uporabljamo različne notranje velikostne standarde (npr. GS-500 LIZ Size Standard pri nekaterih kompletih proizvajalca Applied Biosystems ter notranji velikostni standard ILS 600 pri nekaterih kompletih proizvajalca Promega), ki nam omogoča določanje dolžine fragmentov od 35 do 500 oziroma 600 baznih parov.



Slika 3: Notranji velikostni standard GS-500 (Applied Biosystems).

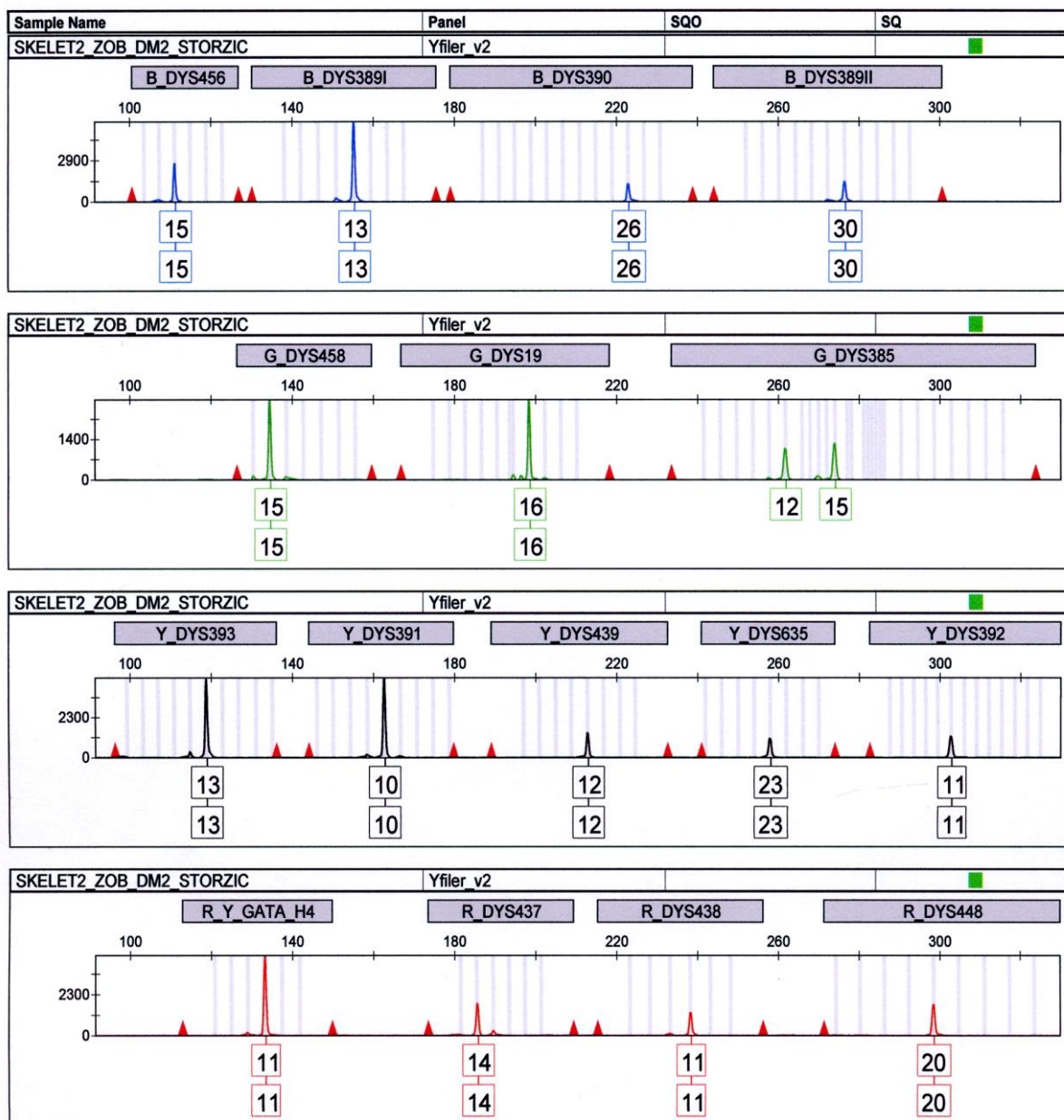
Po ločitvi amplifikacijskih produktov in notranjega velikostnega standarda dobimo sliko, ki jo imenujemo elektroferogram. Vsak vrh predstavlja en alel. Pri avtosomalnih področjih STR sta pri heterozigotu oba vrhova približno enako visoka. Os x nam podaja dolžino fragmentov DNA v baznih parih, os y pa intenziteto fluorescentnega signala v relativnih enotah fluorescence (RFU). Rezultatov tipizacije DNA ne podajamo z dolžino alelov v baznih parih,

ampak mora nomenklatura alelov lokusov STR temeljiti na številu ponovitev osnovnega motiva. To nam močno poenostavi predstavitev genetskih dokazov na sodiščih, hkrati pa lahko neposredno primerjamo rezultate tipizacije enakih vzorcev med različnimi laboratoriji. Za pretvorbo alelnih dolžin v genotype ali haplotipe pri kromosomu Y, izražene s številom ponovitev osnovnega motiva, za vse lokuse uporabljamo t.i. alelne lestvice. Alelno lestvico posameznega lokusa sestavlja večina v svetovnih populacijah znanih alelov tega lokusa. Za neposredno primerjavo vrhov amplifikacijskih produktov z vrhovi alelnih lestvic uporabljamo računalniška programa Data Collection (Applied Biosystems) in GeneMapper ID (Applied Biosystems). Elektroferograme, v oblikah, kot sta prikazani na Sliki 4 in 5, oddajamo kot končne rezultate genetskih preiskav. Na Sliki 4 je prikazan amplifikacijski produkt reakcije AmpF/STR Identifiler (Applied Biosystems), v kateri smo pomnožili avtosomalno jedrno DNA, pridobljeno iz leve stegenice skeleta 3, najdenega v povojnem grobišču pod Storžičem.



Slika 4: Elektroferogram genetskega profila reakcije Identifiler (avtosomalna področja STR), ki smo ga pridobili iz leve stegenice skeleta 3, najdenega v grobišču pod Storžičem.

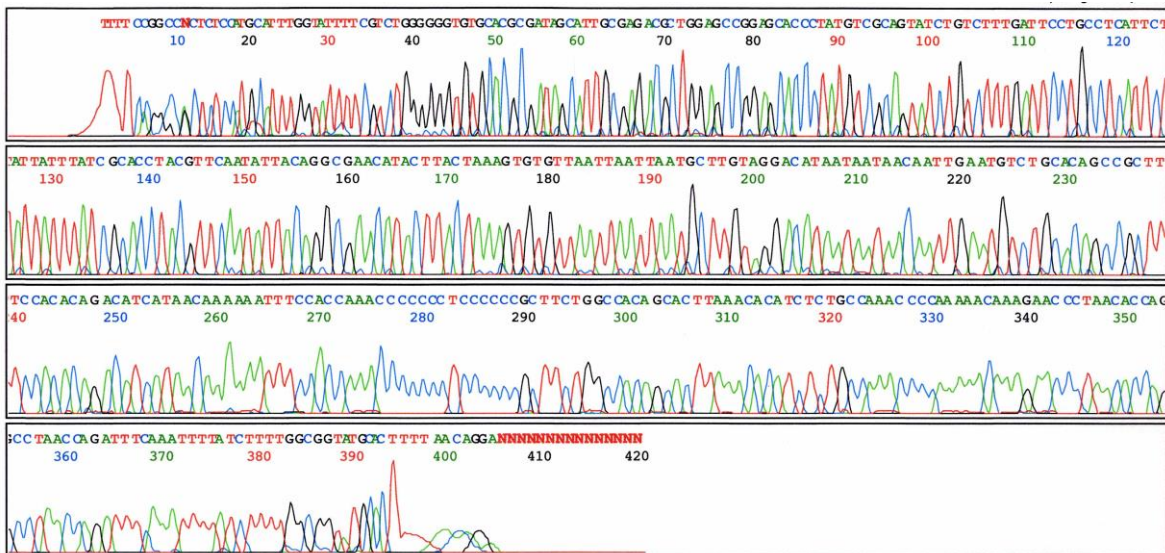
Na Sliki 5 je prikazan amplifikacijski produkt reakcije AmpF/STR Yfiler (Applied Biosystems), v kateri smo pomnožili področja STR kromosoma Y DNA, pridobljene iz zoba (desni kočnik 2) skeleta 2, najdenega v grobišču pod Storžičem.



Slika 5: Elektroferogram genetskega profila reakcije Yfiler (področja STR kromosoma Y), ki smo ga pridobili iz zoba (desni kočnik 2) skeleta 2, najdenega v grobišču pod Storžičem.

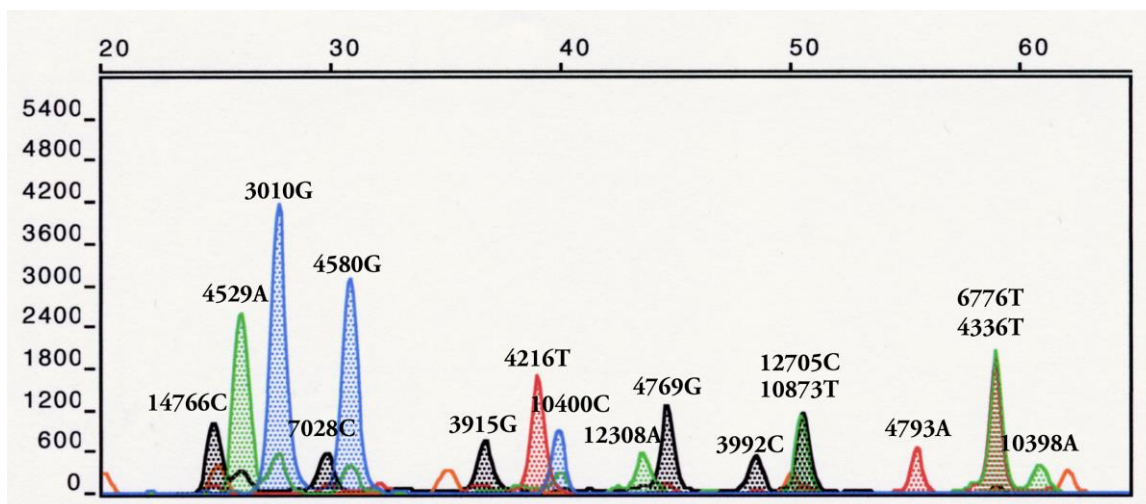
Pri analizi sekvenčnih produktov sočasno zaznamo vse štiri, z različnimi fluorokromi označene baze. Zaporedje baz v sekvenci je določeno z zaporedjem dolžinsko različnih, fluorescentno označenih fragmentov DNA v kapilari. Avtomatsko določanje nukleotidnega zaporedja sekvenčnih produktov poteka s pomočjo računalniških programov Data Collection (Applied Biosystems) in DNA Sequencing Analysis Software (Applied Biosystems). Rezultate tipizacije mtDNA prikazujemo v obliki elektroferogramov, pri katerih vsak vrh

ustreza eni bazi, baze pa se razlikujejo med seboj po barvi. Z modro barvo je označena citozinska baza (C), z zeleno adeninska baza (A), s črno gvaninska baza (G) in z rdečo timinska baza (T). Na Sliki 6 je prikazan elektroferogram nukleotidnega zaporedja celotne hipervariabilne regije HVII lahke verige mtDNA, dobljenega z metodo avtomatskega neposrednega fluorescentnega sekvenciranja.



Slika 6: Sekvenca celotne hipervariabilne regije HVII lahke verige mtDNA, dobljena z metodo avtomatskega neposrednega fluorescentnega sekvenciranja ob uporabi kompleta BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems).

Pri ločevanju minisekvenčnih produktov hkrati analiziramo štiri, z različnimi fluorokromi označene produkte, s petim fluorokromom pa je označen notranji velikostni standard, ki ga ločujemo skupaj z minisekvenčnim produktom posameznega vzorca in nam služi za avtomatsko določanje dolžin posameznih fragmentov enonukleotidnih polimorfizmov s pomočjo računalniškega programa Data Collection (Applied Biosystems).



Slika 7: Elektroferogram 17 hkrati pomnoženih SNP mtDNA v minisekvenčni SNaPshot-reakciji (SNP mtDNA so opisani na lahki verigi, njihova nomenktatura pa temelji na rCRS).

LITERATURA

1. Alaeddini R, Walsh SJ, Abbas A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA - A review. *Forensic Sci Int Genet* 2010;4:148-157.
2. Alghafri R, Zupanič Pajnič I, Zupanc T, Balažič J, Shrivastava P. Rapidly mutating Y-STR analyses of compromised forensic samples. *International journal of legal medicine*. 2018;132:397-403.
3. Allen M, Engström AS, Meyers S, Handt O, Saldeen T, von Haeseler A, Pääbo S, Gyllensten U. Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities. *J Forensic Sci* 1998;43:453-464.
4. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290:457-465.
5. Anslinger K, Weichhold G, Keil W, Bayer B, Eisenmenger W. Identification of the skeletal remains of Martin Bormann by mtDNA analysis. *Int J Legal Med* 2001;114:194-196.
6. Bajželj M, Zupanič Pajnič I. Missing persons genetic identification (in Slovenian). *Zdravniški vestnik*. 2017;86:318-329.
7. Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Holland M.. DNA commission of the International society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Int J Legal Med* 2000;113:193-96.
8. Beauthier JP, De Valck E, Lefevre P, De Winne J. Mass disaster victim identification: the tsunami experience. *Open Forensic Sci J* 2009;2:54-62.
9. Benecke M. DNA typing in forensic medicine and in criminal investigations: a current survey. *Naturwissenschaften* 1997;84:181-188.
10. Biesecker LG, Bailey-Wilson JE, Ballantyne J, Baum H, Bieber FR, Brenner C, Budowle B, Butler JM, Carmody G, Conneally PM, Duceman B, Eisenberg A, Forman L, Kidd KK; Leclair B, Niezgodna S, Parsons TJ, Pugh E, Shaler R, Sherry ST,

- Sozer A, Walsh A. DNA identification after the 9/11 World Trade Center attack. *Science* 2005;310:1122-1123.
11. Bogdanowicz W, Allen M, Branicki W, Lembring M, Gajewska M, Kupiec T. Genetic identification of putative remains of the famous astronomer Nicolaus Copernicus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:12279-82.
 12. Bouakaze C, Keyser C, Amory S, Crubezy E, Ludes B. Pigment phenotype and biogeographical ancestry from ancient skeletal remains: Inferences from multiplex autosomal SNP analysis. *Int J Legal Med* 2009;123:315-325.
 13. Brenner CH. DNA-VIEW 2007 User Guide. 2007;Oakland (CA).
 14. Buel E, Wang G, Schwartz M. PCR amplification of animal DNA with human X-Y amelogenin primers used in gender determination. *J Forensic Sci* 1995;40:641-644.
 15. Butler J. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J forensic Sci* 2006;51:253-265.
 16. Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 1987;325:31-36.
 17. Castella V, Dimo-Simonin N, Brandt-Casadevall C, Robinson N, Sougy M, Taroni F, Mangin P. Forensic identification of urine sample: a comparison between nuclear and mitochondrial DNA markers. *Int J Legal Med* 2006;120:67-72.
 18. Chaitanya L, Zupanič Pajnič I, Walsh S, Balažic J, Zupanc T, Kayser M. Bringing colour back after 70 years: Predicting eye and hair colour from skeletal remains of World War II victims using the HirisPlex system, *Forensic Sci Int: Genet.* 2017;26:48-57.
 19. Coble MD, Loreille OM, Wadhams MJ, Edson SM, Maynard K. Mystery Solved: The Identification of the Two Missing Romanov Children Using DNA Analysis. *PLoS ONE* 2009;4:e4838.
 20. Davoren J, Vanek D, Konjhodžić R, Crews J, Huffine E, Parsons TJ. Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. *Croat Med J* 2007;48:478-485.
 21. Ermini L, Olivieri C, Rizzi E, Corti G, Bonnal R, Soares P, Luciani S, Marota I, De Bellis G, Richards MB, Rollo F. Complete mitochondrial genome sequence of the Tyrolean Iceman. *Curr Biol* 2008;18:1687-93.
 22. Fattorini P, Zupanič Pajnič I, et al. Producing standard damaged DNA samples by heating : pitfalls and suggestions. *Analytical biochemistry.* 2018;549:107-112.
 23. Fattorini P, Zupanič Pajnič I, et al. Prolonged DNA hydrolysis in water: a study on DNA stability. *Data in brief*, 2018, in press, doi: 10.1016/j.ab.2018.03.011
 24. Fisher DL, Holland MM, Mitchell L, Sledzik PS, Wilcox AW, Wadhams M, Weedn VW. Extraction evaluation and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States civil war bone. *J Forensic Sci* 1993;38:60-68.
 25. Foster EA, Jobling MA, Taylor PG, Donnelly P, de Knijffs P, Mieremets R, Zerjal T, Tyler-Smith C. Jefferson Fathered Slave's Last Child. *Nature* 1998;396:27-28.
 26. Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, Sullivan K. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature Genetics* 1994;6:130-136.
 27. Gill P, Kimpton C, Aliston-Greiner R, Sullivan K, Stoneking M, Melton T, Nott J, Barritt S, Roby R, Holland M. Establishing the identity of Anna Anderson Manahan. *Nature Genet* 1995;9:9-10.

28. Golenberg EM. Chloroplast DNA sequence from a miocene Magnolia species. *Nature* 1990;344:656-658.
29. Gornjak-Pogorelc B, Jazbec J, Zupanič-Pajnič I, Balažic J. Molekularno genetska analiza himerizma po alogenski transplanatciji kostnega mozga. V: Molekularna diagnostika v medicini. 15. spominsko srečanje akademika Janeza Miličinskega in 36. memorialni sestanek profesorja Janeza Plečnika in 1. srečanje slovenskega društva za humano genetiko z mednarodno udeležbo, Luzar B., Poljak M., Glavač D., Balažic J. (ur.). Ljubljana: Medicinska fakulteta; 2005. p. 29-41.
30. Graham EAM. Disaster victim identification. *Forensic Sci Med Patol* 2006;2:203-207.
31. Graham EAM. DNA reviews: Ancient DNA. *Forensic Sci Med Pathol* 2007;3:221-225.
32. Grimes EA. Sequence polymorphisms in the human melanocortin 1 receptor gene as an indicator of the red hair phenotype. *Forensic Sci Int* 2001;122:124-129.
33. Gusmao L, Butler JM, Carracedo A, Gill P, Kayser M, Mayr WR, Morling N, Prinz M, Roewer L, Tyler-Smith C, Schneider PM. DNA commission of the international society of forensic genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y STRs in the forensic analysis. *Int J Legal Med* 2006;120:191-200.
34. Handt O. Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science* 1994;264:1775-1778.
35. Herrmann B., Hummel S. Ancient DNA: recovery and analysis of genetic material from paleontological, archeological, museum, medical, and forensic specimens. Berlin: Springer-Verlag; 1994.
36. Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, Rodriquez WC, Canik JJ, Merrill CR. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains. Identification of remains from the Vietnam war. *J Forensic Sci* 1993;38:542-553.
37. Hopwood AJ, Mannucci A, Sullivan KM. DNA typing from human faeces. *Int J Legal Med* 1996;108:237-243.
38. Horai S, Hayasaka K. Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Am J Human Genet* 1990;46:828-42.
39. Hummel S. Ancient DNA typing: methods, strategies and applications. Berlin: Springer-Verlag; 2003.
40. Irwin JA, Edson SM; Loreille O, Just RS, Barritt SM, Lee DA, Holland TD, Parsons TJ, Leney MD. DNA identification of »Earthquake McGoon« 50 years postmortem. *J Forensic Sci* 2007;52:1115-1118.
41. Irwin JA, Leney MD, Loreille O, Barritt SM, Christensen AF, Holland TD, Smith BC, Parsons TJ. Application of low copy number STR typing to the identification of aged, degraded skeletal remains. *J Forensic Sci* 2007;52:1322-1327.
42. Ivanov PI, Wadhams MJ, Roby RK, Holland MM, Weedn VW, Parsons TJ. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nature Genetics* 1996;12:417-420.
43. Jakovski Z, Nikolova K, Jeneska B, Cakar Z, Stankov A, Poposka V, Pavlovski G, Duma A. Forensic DNA analysis in the identification of human remains in mass graves. *J Clin Path Forensic Med* 2010;1:1-4.
44. Jeffreys AJ, Allen MJ, Hagelberg E, Sonnberg A. Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. *Forensic Sci Int* 1992;56:65-76.
45. Jeffreys AJ, Brookfield JFY, Semeonoff R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 1985;317:818-819.

46. Jeffreys AJ. DNA typing: approaches and applications. *J Forensic Sci Soc* 1993;33:204-211.
47. Jehaes E, Toprak K, Vanderheyden N, Pfeiffer H, Cassiman JJ, Brinkmann B, Decorte R. Pitfalls in the analysis of mitochondrial DNA from ancient specimens and the consequences for forensic DNA analysis: the historical case of the putative heart of Louis XVII. *Int J Legal Med* 2001;115:135-141.
48. Jehaes E. Mitochondrial DNA analysis on remains of a putative son of Louis XVI, King of France and Marie-Antoinette. *Europ J Hum Gen* 1998;6:383-395.
49. Jobling MA, Gill P. Encoded evidence; DNA in forensic analysis. *Nature Reviews* 2004;5:739-751.
50. Krings M. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 1997;90:19-30.
51. LaFountain M, Schwartz M, Cormier J, Buel E. Validation of capillary electrophoresis for analysis of the X-Y homologous amelogenin gene. *J Forensic Sci* 1998;43:1188-1194.
52. Lalueza-Foc C, Rompler H, Caramelli D. A melanocortin 1 receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals. *Science* 2007;318:1453-1455.
53. Lee HY, Kim NY, Park MJ, Sim JE, Yang WI, Shin KJ. DNA typing for the identification of old skeletal remains from Korean war victims. *J Forensic Sci* 2010;55:1422-1429.
54. Lee HY, Park MJ, Kim NY, Sim JE, Yang WI, Shin KJ. Simple and highly effective DNA extraction method from old skeletal remains using silica columns. *Forensic Sci Int Genet* 2010;4:275-280.
55. Liu F, van Dujin K, Vingerling JR, Hofman A, Uitterlinden AG, Janssens AC, Kayser M. Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. *Curr Biol* 2009;19:192-193.
56. Leonart R, Rirgo E, Sainz de la Pena MV, Bacallao K, Amaro F. Forensic identification of skeletal remains from members of Ernesto Che Guevara's guerrillas in Bolivia based on DNA typing. *Int J Legal Med* 2000;113:98-101.
57. Morling N. Forensic genetics. *Lancet* 2004;364:10-11.
58. Mukaida M, Kimura H, Takada Y, Masuda T, Nakata Y. The personal identification of many samples recovered from under the sea. *Forensic Sci Int* 2000;113:79-85.
59. Olaisen B, Stenersen M, Mevag B. Identification by DNA analysis of the victims of the august 1996 Spitsbergen civil aircraft disaster. *Nature Genet* 1997;15:402-405.
60. Paabo S. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 1985;314:644-646.
61. Parson W, Brandstätter A, Niederstätter H, Grubwieser P, Scheithauer R. Unravelling the mystery of Nanga Parbat. *Int J Legal Med* 2006;121:309-310
62. Parson W, Dür A. EMPOP - A forensic mtDNA database. *Forensic Sci Int: Genetics* 2007;1:88-92.
63. Pfeiffer H, Benthaus S, Rolf B, Brinkmann B. The Kaiser's tooth. *Int J Legal Med* 2003;117:118-120.
64. Piercy R, Sullivan KM, Benson N, Gill P. The application of mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian genetic identification. *Int J Legal Med* 1993;106:85-90.
65. Primorac D, Marjanović D. Analiza DNA u sudskoj medicine I pravosuđu. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
66. Prinz M, Carracedo A, Mayr WR, Morling N, Parsons TJ, Sajantila A, Scheithauer R, Schmitter H, Schneider PM. DNA Commission of the International Society for

- Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victims identification (DVI). *Forensic Sci Int: Genetics* 2007;1: 3-12.
67. Rickards O, Martinez-Labarga C, Favaro M, Frezza D, Mallegni F. DNA analyses of the remains of the Prince Branciforte Barresi family. *Int J Legal Med* 2001;114:141-6.
 68. Sajantila A, Strom M, Budowle B, Karhunen PJ, Peltonen L. The polymerase chain reaction and post-mortem forensic identity testing: application of amplified D1S80 and HLA-DQ α loci to the identification of fire victims. *Forensic Sci Int* 1991;51:23-34.
 69. Scharf SJ, Smith AG, Hansen JA, McFarland C, Erlich HA. Quantitative determination of bone marrow transplant engraftment using fluorescent polymerase chain reaction primers for human identity markers. *Blood* 1995;85:1954-1963.
 70. Sigurdardottir S, Helgason A, Gulcher JR, Stefansson K, Donnelly P. The mutation rate in the human mtDNA control region. *Am J Human Genet* 2000;66:1599-1609.
 71. Šterlinko H, Zupanič Pajnič I, Balažič J, Komel R. Human Y-specific STR haplotypes in a Slovenian population sample. *Forensic Sci Int* 2001;120:226-228.
 72. Stone AC, Starrs JE, Stoneking M. Mitochondrial DNA analysis of the presumptive remains of Jesse James. *J Forensic Sci* 2001;46:173-176.
 73. Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *BioTechniques* 1993;15:636-641.
 74. Tully G, Bär W, Brinkmann B, Carracedo A, Gill P, Morling N. Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. *Forensic Sci Int* 2001;124:83-91.
 75. Valenzuela R, Henderson M, Walsh M, Garrison N, Kelch J, Cohen-Barak O, Erickson D, John Meaney F, Bruce Walsh J, Cheng K, Ito S, Wakamatsu K, Frudakis T, Thomas M, Brilliant M. Predicting phenotype from genotype: Normal pigmentation. *J Forensic Sci* 2010;55:315-322.
 76. Vallone PM, Just RS, Coble MD, Butler JM, Parsons TJ. A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *Int J Legal Med* 2004;118:147-157.
 77. Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 1995;11:328-330.
 78. Vanek D, Saskova L, Koch H. Kinship and Y-chromosome analysis of 7th century human remains: Novel DNA extraction and typing procedure for ancient material. *Croat Med J* 2009;50:286-295.
 79. Walsh B, Redd AJ, Hammer MF. Joint match probabilities for Y chromosomal and autosomal markers. *Forensic Sci Int* 2008;174: 234-238.
 80. Willuweit S, Roewer L. Y chromosome haplotype reference database (YHRD): Update. *Forensic Sci Int: Genetics* 2007;1:83-87.
 81. Zupanc T, Balažič J, Štefanič B and Zupanič Pajnič I. Performance of the Human Quantifiler, the Investigator Quantiplex, and the Investigator ESSplex Plus kit for quantification and nuclear DNA typing of old skeletal remains. *Rom J Legal Med* 2013;21(2):119-124.
 82. Zupanič I, Balažič J, Komel R. Analysis of nine short tandem repeat (STR) loci in the Slovenian population. *Int J Legal Med* 1998;111:248-250.
 83. Zupanič I. Genetski detektivi: prepoznavanje oseb in preverjanje sorodstvenih povezav s pomočjo preiskave DNA. *Proteus* 1998;60(9-10):400-5.

84. Zupanič I. Uvedba preiskave DNA za prepoznavanje oseb in preverjanje sorodstvenih povezav v slovenski populaciji (magistrska naloga). Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 1999.
85. Zupanič Pajnič I, Balažic J, Komel R. Sequence polymorphism of the mitochondrial DNA control region in the Slovenian population. *Int J Legal Med* 2004;118:1-4.
86. Zupanič Pajnič I, Debska M, Gornjak Pogorelc B, Vodopivec Mohorčič K, Balažic J, Zupanc T, Štefanič B, Geršak K. Highly efficient automated extraction of DNA from old and contemporary skeletal remains. *J For Leg Med.* 2016;37:78-86.
87. Zupanič Pajnič I, Gornjak Pogorelc B, Balažic J, Horvat M. Molecular genetic analyses of skeleton excavated from Auersperg Chapel archaeological site in Slovenia. In: *DNA in forensics 2012: "exploring the phylogenies"*. Abstract book and conference program of the 5th EMPOP meeting, 8th Y-chromosomal user workshop; 2012 Sep 6-8; Innsbruck. Innsbruck: 2012; 108.
88. Zupanič Pajnič I, Petaros A, Balažic J, Geršak K. Searching for the mother missed since the Second World War. *J For Leg Med.* 2016;44:138-142.
89. Zupanič Pajnič I, Šterlinko H, Balažic J, Komel R. Parentage testing with 14 STR loci and population data for 5 STRs in the Slovenian population. *Int J Legal Med* 2001;114:178-180.
90. Zupanič Pajnič I, Zupanc T, Balažic J, Geršak ŽM, Stojković O, Skadrić I, Črešnar M. Prediction of autosomal STR typing success in ancient and Second World War bone samples. *Forensic Sci Int: Genet.* 2017;27:17-26.
91. Zupanič Pajnič I. (2016) Extraction of DNA from human skeletal material, in: Goodwin W (Ed), *Forensic DNA Typing Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol 1420, doi 10.1007/978-1-4939-3597-0_7, Springer Science&Business Media, LLC, New York, pp 89-108.
92. Zupanič Pajnič I. Evaluation of the quality of bone powder for successful STR typing of human skeletal remains. *Rom J Leg Med*, 2017;25:92-98.
93. Zupanič Pajnič I. Forenzična genetika. *Med Razgl* 2011;50:325-340.
94. Zupanič Pajnič I. Genetic identification of Second World War victim's skeletal remains. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2013. ISBN 978-3-659-45306-9.
95. Zupanič Pajnič I. Identifikacija oseb iz starih in slabo ohranjenih bioloških materialov s polimorfizmi mitohondrijske DNA (doktorska disertacija). Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2007.
96. Zupanič Pajnič I. Molecular genetic analyses of 300 years old skeletons from Auersperg tomb. *Zdrav Vestn* 2013, in press.
97. Zupanič Pajnič I. Molekularno genetska identifikacija domobranskih žrtev. (Molecular genetic identification of the Slovene home guard victims). *Zdrav Vestn.* 2008;77(11):745-750.
98. Zupanič Pajnič I. Molekularno genetska identifikacija neznanih trupel iz skeletnih ostankov in zob. V: *Molekularna diagnostika v medicini*. 15. spominsko srečanje akademika Janeza Miličinskega in 36. memorialni sestanek profesorja Janeza Plečnika in 1. srečanje slovenskega društva za humano genetiko z mednarodno udeležbo, Luzar

- B., Poljak M., Glavač D., Balažic J. (ur.). Ljubljana: Medicinska fakulteta; 2005. p. 73-84.
99. Zupanič Pajnič I. Visoko učinkovita metoda ekstrakcije DNA iz skeletnih ostankov. *Zdrav Vestn* 2011;80:171-181.
 100. Zupanič-Pajnič I, Balažic J, Komel R, Golouh R. Identifikacija tkivnih vzorcev z molekularno biološkimi metodami. *Onkologija* 2002;6(1):17-20.
 101. Zupanič-Pajnič I, Gornjak-Pogorelc B, Balažic J, Zupanc T, Štefanič B. Highly efficient nuclear DNA typing of the World War II skeletal remains using three new autosomal Short Tandem Repeat amplification kits with the extended European Standard Set of loci. *Croat Med J* 2012; 53(1):17-23.
 102. Zupanič-Pajnič I, Gornjak-Pogorelc B, Balažic J. Molecular genetic identification of skeletal remains from the Second world war Konfin I mass grave in Slovenia. *Int J Legal Med* 2010;124(4):307-17.
 103. Zupanič-Pajnič I, Gornjak-Pogorelc B, Balažic J. Molecular genetic identification of skeletal remains from the Second world war Konfin I mass grave in Slovenia. *Int J Legal Med.* 2010; 124(4):307-17.
 104. Zupanič-Pajnič I. A comparative analysis of the AmpF/STR Identifiler and PowerPlex 16 autosomal Short Tandem Repeat (STR) amplification kits on the skeletal remains excavated from Second World War mass graves in Slovenia. *Rom J Legal Med* 2013;21(1):73-78.
 105. Zupanič-Pajnič I. Molekularno genetska (DNK) identifikacija bioloških sledi. V: *Odvetniška šola. Bernardin: Odvetniška zbornica Slovenije; 2010. p. 71-73.*
 106. Zupanič-Pajnič I. Molekularno genetska identifikacija domobranskih žrtev. *Zdrav Vestn* 2008;77(11):745-50.
 107. Zupanič-Pajnič I. Molekularno genetska identifikacija žrtev medvojnih pobojev pod Storžičem. V: *Dežman J, ur. Poročilo Komisije vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč 2005-2008. Ljubljana: Družina; 2008. p. 219-250.*
 108. Zupanič-Pajnič I. Priporočila za molekularno genetsko identifikacijo žrtev povojnih pobojev v Sloveniji. V: *Dežman J, ur. Poročilo Komisije vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč 2005-2008. Ljubljana: Družina; 2008. p. 133-146.*
 109. ZUPANIČ-PAJNIČ, Irena. Identificirane žrtve grobišča pri Konfinu I. V: *DEŽMAN, Jože (ur.). Resnica in sočutje : prispevki k črni knjigi titoizma : poročilo 3 : poročilo Komisije Vlade RS za reševanje vprašanj prikritih grobišč 2009-2011. Ljubljana: Družina, 2011, str. 397-471.*
 110. ZUPANIČ-PAJNIČ, Irena. Identifikacija bioloških sledi z molekularno genetskimi metodami. *Pravosod. bilt., 2011, letn. 32, št. 2, str. 299-325.*
 111. ZUPANIČ-PAJNIČ, Irena. Molekularno genetska identifikacija skeletnih ostankov = Molecular genetic identification of skeletal remains. *Med. razgl.* 2013;52(2):213-234.
 112. ZUPANIČ-PAJNIČ, Irena. Preverjanje identitete arhiviranih bioloških vzorcev ob sumu na njihovo zamenjavo. *Pravosod. bilt., 2011, letn. 32, št. 2, str. 285-297.*

