Uporaba mitohondrijske DNA v forenzičnih preiskavah

Mitochondrial DNA in forensic analyses

Irena Zupanič Pajnič

Izvleček

Prispevek na pregleden način opisuje uporabo mitohondrijske DNA (mtDNA) v forenzičnih preiskavah. Pri starih in slabo ohranjenih bioloških vzorcih tipizacija jedrne DNA pogosto ni uspešna, lahko pa preiskujemo polimorfizme mtDNA, ki je zaradi številnih kopij na celico in krožne oblike manj izpostavljena razgradnji in se ohrani daljši čas. Osredinili se bomo na kontrolno regijo mtDNA, ki je zaradi svoje polimorfnosti v forenzičnih preiskavah najbolj uporabna, in opozorili na heteroplazmijo, ki jo je potrebno upoštevati pri identifikaciji posameznikov in bioloških sledi. Slabo ohranjeni biološki vzorci so predvsem stari skeletni ostanki – kosti in zobje, stari nohti, feces, urin ter izpadli lasje. Pri slednjih gre za mikrosledove, ki jih kriminalisti pogosto najdejo na krajih kaznivih dejanj. Posamezen tip biološkega materiala bomo podrobneje opisali. Poleg zgradbe bomo namenili posebno pozornost vplivom okolja na ohranitev DNA v posameznem tipu biološkega materiala, optimizaciji ekstrakcijskih metod za učinkovito izolacijo in optimalno vzorčenje. Zaradi nizkih količin DNA so ti vzorci izpostavljeni kontaminaciji z DNA oseb, ki sodelujejo pri postopkih zbiranja in genetskih preiskavah. Za preprečevanje in sledenje morebitni kontaminaciji upoštevamo različne ukrepe, ki jih bomo opisali. Uporaba mtDNA je v forenzični dejavnosti zelo široka, zato bomo prispevek zaključili s predstavitvijo preiskav mtDNA v Sloveniji in po svetu.

Inštitut za sodno medicino, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Institute of Forensic Medicine, Faculty of medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

Korespondenca/ Correspondence:
Irena Zupanič Pajnič, e: irena.zupanic.pajnic@gmail.com

Ključne besede:
arheogenetika; človeški skeletni ostanki; poškodovana DNA; kontaminacija

Key words:
archaeogenetics; human skeletal remains; damaged DNA; contamination

PrispeloReceived: 29. 1. 2019 SprejetoAccepted: 14. 8. 2019

Abstract

This review article presents mitochondrial DNA (mtDNA) analyses in forensic genetics. Typing of nuclear DNA in old and poorly preserved biological samples is often unsuccessful and instead of nuclear DNA, mtDNA polymorphisms can be used for human identification. Due to its multy copy nature and circular conformation, MtDNA is less prone to degradation and is retained longer. The most polymorphic control region is regularly used in forensic casework, and mtDNA heteroplasmy must be considered in the identification cases and analyses of biological traces. The poorly preserved biological samples are mainly old skeletal remains - bones and teeth, old nails, feces, urine and hair shafts. The latter are micro traces, often found by criminalists at crime scenes. We will describe each type of biological material in more detail. In addition to morphological structure, we will pay special attention to the environmental impacts on the preservation of DNA in each type of biological material, optimization of extraction methods for effective isolation and optimal sampling. Due to low amounts of DNA, these samples are exposed to DNA contamination from personnel involved in sampling procedures and genetic testing. Different measures used to prevent and track potential contamination will be described. MtDNA analyses are often used in forensics to solve different cases, and some applications of mtDNA in Slovenia and worldwide will be discussed.

Citirajte kot/Cite as: Zupanič Pajnič I. [Mitochondrial DNA in forensic analyses]. Zdrav Vestn. 2019;88(Epub ahead of print):1–17.

DOI: 10.6016/ZdravVestn.2932

1 Uvod

Na Inštitutu za sodno medicino Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani od leta 1996 opravljamo molekularnogenetsko identifikacijo oseb in bioloških sledi ter preverjamo bližnje sorodstvene povezave z metodo genetskega profiliranja jedrne DNA (1), pri kateri preiskujemo dolžinske polimorfizme mikrosatelitskih lokusov razmeroma dobro ohranjenih bioloških vzorcev. Vendar pa z metodo genetskega profiliranja jedrne DNA identifikacija starih in slabo ohranjenih bioloških materialov pogosto ni uspešna. Zato smo leta 2004 uvedli metodo tipizacije mtDNA (2). Problematični biološki vzorci so stari skeletni ostanki (kosti 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). Našteti biološki materiali vsebujejo zelo malo jedrne DNA, ali pa je ta preveč razgrajena za pridobitev mikrosatelitskega genetskega profila. Zato opravimo preiskave sekvenčnih polimorfizmov mtDNA, saj se ta nahaja v celici v številnih kopijah in je zaradi krožne oblike manj izpostavljena razgradnji. To ji omogoča daljšo ohranitev v starih in slabo ohranjenih bioloških materialih (3). Pri tipizaciji mtDNA preiskujemo polimorfizme najbolj variabilne nekodirajoče kontrolne regije (hipervariabilne regije HVI, HVII in HVIII), dodatno pa povečamo diskriminacijsko moč s preiskavo enonukleotidnih polimorfizmov (*angl.* Single Nucleotide Polymorphism, SNP) kodirajoče regije, kar nam poveča možnost razlikovanja oseb z identičnimi haplotipi kontrolne regije (4). Ob metodi genetskega profiliranja jedrne DNA nam tipizacija mtDNA v rutinskih preiskavah omogoča celosten pristop k molekularnogenetskim identifikacijam biološkega materiala v sodni medicini in kriminalistiki. Kadar analiza jedrne DNA zaradi premajhne količine genetskega materiala ali njegove razgrajenosti ni uspešna, uporabimo za identifikacijo metodo tipizacije mtDNA.

Del člankov, ki so navedeni v poglavju Literatura, sem pregledala v doktorski disertaciji (5), manjši del pa jih je v magistrskem delu pregledal Marcel Obal (6) in jih v tem preglednem članku povzemamo.

2 Mitohondrijski genom

Mitohondrijska DNA pri človeku predstavlja 0,3 % genomske DNA. Je dvoverižna, kovalentno zaprta krožna molekula, ki jo sestavljata zunanja težka veriga (veriga H) in notranja lahka veriga (veriga L). Prva vsebuje več purinskih baz, druga pa je bogata s pirimidinskimi bazami. MtDNA je dolga 16.569 bp in ima v celoti določeno nukleotidno zaporedje (7). Sestavljena je iz prevladujoče konservativne kodirajoče regije s 37 geni in variabilne nekodirajoče kontrolne re-

gije. Mitohondriji se ne tvorijo na novo, ampak nastanejo z rastjo in delitvijo obstoječih v vsaki celični generaciji. Celoten proces podvajanja se uravnava in zagotavlja v celici stalno količino mtDNA (8). Mutacije v mtDNA lahko povzročajo dedne bolezni, ki se dedujejo po materi in se prenesejo na vse njene potomce, ne glede na spol. Vzrok je v tem, da vsi mitohondriji v jajčnih celicah (pri sesalcih oociti vsebujejo približno 200.000 molekul mtDNA) izvirajo iz izolirane populacije molekul mtDNA. Pri raziskavah zgodnjih faz embrionalnega razvoja so namreč ugotovili, da se nahaja v ženski primordialni klični liniji le nekaj molekul mtDNA (8). Bendall (9) predpostavlja, da je za človeka značilen mehanizem genetskega ozkega grla, ki vsebuje zelo nizko število segregacijskih enot, saj je opazil razlike v stopnji heteroplazmije že v eni generaciji (med potomci iste matere) in segregacijo heteroplazmije v homoplazmijo že v dveh generacijah. Mehanizem ozkega grla z malim številom segregacijskih enot omogoča hitro fiksiranje mutacij v mtDNA (10).

Človeške celice vsebujejo številne kopije mitohondrijskega genoma, kar daje, v primerjavi z le dvema kopijama jedrnega genoma, veliko večjo možnost ekstrakcije mtDNA iz starih ali slabo ohranjenih vzorcev, kot so (izpadli) telogeni lasje, stare kosti, zobje, feces, urin in nohti (11). Vsaka celica vsebuje približno 500 mitohondrijev, vsak mitohondrij 5 do 10 molekul mtDNA; tako se v metabolno aktivnih celicah nahaja 1000 do 10.000 molekul mtDNA. Veliko mitohondrijev vsebujejo srčno tkivo (polovico prostornine citoplazme tvorijo mitohondriji) ter jetrno in mišično tkivo. Največ molekul mtDNA vsebujejo oociti, najmanj pa spermijske celice (le nekaj 100) (8). Pri identifikaciji starih in slabo ohranjenih bioloških materialov je prednost uporabe mtDNA pred jedrno DNA tudi v tem, da se ohrani daljši čas, saj jo pred razgradnjo z eksonukleazami ščitita krožna oblika in mitohondrijska ovojnica (12). Zaradi naštetih lastnosti mtDNA lahko biološke vzorce, katerih tipizacija jedrne DNA ni uspešna, identificiramo s polimorfizmi mtDNA, vendar zaradi odsotnosti rekombinacije identificiramo maternalno linijo, ki ji biološki vzorec ali sled pripada, in ne posameznika.

Mitohondriji se nahajajo v citoplazmi, zato se mtDNA deduje neodvisno od jedrnega genoma. Pri človeku se mtDNA deduje po materi. Zaradi maternalnega dedovanja in odsotnosti rekombinacije obravnavamo nukleotidno zaporedje mtDNA kot enolokusno ali haplotipsko (13). MtDNA se v nespremenjeni obliki prenese na vse materine potomce ne glede na spol, zato uporabljamo njena nukleotidna zaporedja kot označevalce za maternalne rodovnike, kar je potrebno upoštevati pri izbiri referenčnega oziroma primerjalnega vzorca v identifikacijskih testih. Osebe z enakimi zaporedji nukleotidov mtDNA imajo skupnega ženskega prednika (3), kar je osnova za prepoznavanje bioloških vzorcev s tipizacijo mtDNA.

3 Kontrolna regija mtDNA

Najbolj variabilni del mtDNA je 1122 bp dolga nekodirajoča kontrolna regija. Natančneje lahko omejimo sekvenčni polimorfizem predvsem na dva, 300 do 400 bp dolga, hipervariabilna segmenta, ki se nahajata znotraj zanke D (14). Prvi segment, ki ga najdemo na mestu 16.024–16.365, imenujemo hipervariabilna regija 1 (HVI), drugega, na mestu 73–340, pa hipervariabilna regija 2 (HVII). Obe regiji sta med osebami, nesorodnimi po materini liniji, zelo polimorfni (3). HVI ima večje število sekvenčno variabilnih mest in nižjo frekvenco posameznih polimorfizmov, HVII pa manjše število

sekvenčnih polimorfizmov, ki imajo višjo frekvenco (15). Poleg regij HVI in HVII je v kontrolni regiji mtDNA tudi regija HVIII (na mestu 438–574), katere variabilnost je veliko manjša kot variabilnost regij HVI in HVII (16). Kontrolna regija mtDNA ima vsaj 5-krat višjo mutacijsko stopnjo kot preostala mtDNA (17). Zaradi svoje polimorfnosti je najbolj raziskano področje molekule mtDNA, zato je izredno uporabna za identifikacijo (18). Evropejci kavkazijske rase se med seboj razlikujemo na regijah HVI in HVII povprečno na 8 nukleotidnih mestih, kar je približno 1,5-odstotna nukleotidna raznolikost (19). Raznolikost mtDNA je 5- do 10-krat višja med rasami kot znotraj posameznih ras, ki so med seboj precej podobne (20). Raznolikost znotraj črnske rase je veliko večja kot znotraj azijske, belske ali hispanske rase, po variabilnosti pa črnski rasi sledi azijska rasa (17). Zaradi velike variabilnosti mtDNA znotraj in med populacijami lahko s polimorfizmi mtDNA ugotavljamo genetsko strukturo populacij, filogenetske odnose med njimi ter migracije in moderno poselitev sveta.

Nukleotidno zaporedje lahke verige mtDNA, ki nam v forenzičnih preiskavah služi kot referenčni standard pri določanju nomenklature haplotipov mtDNA, je prvi opisal Anderson (7) in ga zato imenujemo Andersonova sekvenca ali Cambridge Reference Sequence (CRS) (13). Nomenklatura haplotipov mtDNA temelji na priporočilih komisije ISFG (International Society for Forensic Genetics) in skupine EDNAP (European DNA profiling group) (13). Kadar opazimo razliko med preiskovanim haplotipom mtDNA in Andersonovo sekvenco, označimo le nukleotidna mesta, na katerih smo razliko opazili, pri čemer navajamo sekvenčne razlike v lahki verigi mtDNA (21).

Pri uporabi mtDNA v forenzične namene moramo biti pozorni na možen pojav heteroplazmije (heterogenost molekul mtDNA znotraj posameznika). V preteklosti je veljalo mnenje, da je mtDNA posameznika homoplazmična, danes pa vemo, da je heteroplazmija do določene mere prisotna pri vseh ljudeh, vendar z nizko stopnjo (pri 5–10 % ljudi) (22). Heteroplazmija je prisotnost dveh ali več tipov molekul mtDNA v citoplazmi; od tod ime heteroplazmija. Bolj splošno pa heteroplazmijo opredelimo kot mešanico multiplih (običajno dveh glavnih) populacij mtDNA pri posamezniku. Heteroplazmija lahko nastopa na ravni celic (posamezna celica je homoplazmična, različne celice pa so med seboj heteroplazmične), na ravni mitohondrijev (posamezen mitohondrij je homoplazmičen, različni mitohondriji so med seboj heteroplazmični, zato je posamezna celica heteroplazmična) in na ravni molekul mtDNA (posamezen mitohondrij je heteroplazmičen) (23). Pri regijah HVI in HVII sta bili opaženi dve vrsti heteroplazmije, in sicer točkovna in dolžinska. Dolžinska je v populaciji veliko pogostejša in se kaže kot variacija v številu citozinskih baz v homopolimernem odseku (19). Točkovna heteroplazmija se v populaciji redkeje pojavlja od dolžinske (24). Heteroplazmija se podeduje ali je posledica somatskih mutacij, do katerih pride v času življenja posameznika (22). Kadar je stopnja heteroplazmije visoka in je prisotna v vseh tkivih, je najverjetneje podedovana od matere; če nastopa le v posameznih tkivih, je posledica somatskih mutacij. Stopnja heteroplazmije se med različnimi tkivi razlikuje in narašča s starostjo posameznika, najvišja pa je pri laseh (25). V forenzičnih preiskavah je bila prvič opisana heteroplazmija v kontrolni regiji mtDNA pri identifikaciji ruskega carja Nikolaja II (26,27). Heteroplazmično mesto

16169 so potrdili tudi pri carjevem bratu Georgiju Romanovu, medtem ko je pri 4 generacije oddaljenih še živečih sorodnikih zaradi segregacije heteroplazmije prišlo na tem mestu do homoplazmije. Identičnost haplotipov carja in njegovega brata je dokončno potrdila pozitivno identifikacijo skeletnih ostankov carja Nikolaja II (27). Tudi Parsons (28) ugotavlja, da je za človeka značilna zelo hitra segregacija sekvenčnih variant med generacijami, saj je opazil segregacijo heteroplazmije v homoplazmijo že v dveh generacijah.

Mitohondrijski genom ima 5- do-10-krat višjo mutacijsko stopnjo od jedrnega, kar je verjetno posledica pogostih napak pri podvajanju in nižje učinkovitosti popravljalnih mehanizmov. Metabolno aktivnejša tkiva z višjimi energetskimi potrebami zaradi oksidativnih poškodb hitreje kopičijo mutacije (25). Zaradi visokih mutacijskih stopenj mtDNA lahko opazimo razlike med haplotipi že med bližnjimi sorodniki po materini liniji (na primer med materjo in otrokom), razlike med haplotipi pa lahko opazimo tudi v somatskih tkivih, zlasti kot posledico segregacije obstoječe heteroplazmije pri posamezniku. To pomeni, da lahko pride do razlik med haplotipi mtDNA med različnimi lasmi in/ali tkivi znotraj posameznika (24). Poznavanje mutacijske stopnje kontrolne regije mtDNA je pomembno tako za evolucijske študije kot za forenzične identifikacijske teste. Povprečno se mutacijska stopnja kontrolne regije mtDNA ocenjuje na 10^{-5} do 10^{-6} mutacij na nukleotid na generacijo (29). Parsons (28) je določil mutacijsko stopnjo na 0,03 mutacij na generacijo. Če je skupna dolžina regij HVI in HVII mtDNA 608 bp in predpostavimo, da traja ena generacija 20 let, lahko ocenimo to mutacijsko stopnjo na 2,5 mutacij/nukleotid/milijon let.

Problematične, slabo ohranjene biološke vzorce, ki jih v forenzičnih raziskavah najpogosteje preiskujemo s tipizacijo mtDNA, predstavljajo stari skeletni ostanki – kosti in zobje, stari nohti, mikrosledovi v kriminalističnih primerih – zlasti izpadli, telogeni, lasje ter feces in urin.

4 Kosti

Kosti glede na obliko delimo na dolge, kratke, ploščate, nepravilnih oblik in sezamoidne. Makroskopsko delimo kostnino na kompaktno in spongiozno. Prva je gosta in neporozna, razmerje med površino in prostornino je majhno, druga pa je močno porozna in ima veliko razmerje med površino in prostornino. Kompaktna sestavlja zunanji del koncev dolgih kosti (epifiza) in ploščatih kosti ter srednji del dolgih kosti (diafiza). Spongiozno najdemo v notranjosti ploščatih kosti in v koncih dolgih kosti. Srednji deli dolgih kosti so znotraj votli – prostor imenujemo medularni kanal, zapolnjuje ga rumeni kostni mozeg (30). Kompaktno kostnino sestavljajo ponavljajoče se strukturne enote, imenovane osteoni. Skozi središče vsakega od njih vzdolž kosti poteka centralni (Harvesov) kanal, v katerem so krvne in limfne žile ter živci, prečno pa Harvesove kanale med seboj povezujejo Volkmannovi kanali. V vsakem osteonu Harvesov kanal obdajajo koncentrične lamele, med njimi pa so področja, imenovana lakune, v katerih se nahajajo zrele kostne celice osteociti. Lakune so med seboj povezane s kanalikuli, majhnimi kanali, ki sodelujejo pri prenosu hranilnih snovi iz Harvesovega kanala do osteocita in pri odvajanju odpadnih snovi iz osteocita. Spongiozna kostnina ne vsebuje osteonov, temveč jo sestavljajo trabekule, premrežene kostne ploščice, ki prav tako vsebujejo lamele, lakune, osteocite in ka-

nalikule, ter rdeč kostni mozeg, ki vsebuje krvne žile, ki prehranjujejo osteocite. Zaradi krhkosti spongiozne kostnine le-ta potrebuje zunanjo zaščitno plast kompaktne kostnine (31).

Mikroskopsko kost sestavljajo celice in medcelična snov. Medcelična snov sestoji iz organskega in anorganskega dela. Organski del v največji meri predstavlja kolagen tipa I in nekateri drugi proteini in glikoproteini (glikozaminoglikani, osteokalcin, osteonektin, osteopontin, sialoprotein), anorganski del pa hidroksiapatit, sestavljen iz kalcijevih in fosfatnih ionov. Celice, ki sestavljajo kosti, so osteoblasti, osteociti in osteoklasti ter sodelujejo v gradnji, resorpciji in mineralizaciji kosti. Aktivni osteoblasti so nezrele kostne celice in sodelujejo pri izgradnji medcelične snovi; izločajo hormone (prostaglandine) in encim (alkalna fosfataza), ki sodelujejo pri mineralizaciji, prav tako pa izločajo organski del kostnega matriksa, ki se imenuje osteoid. Sestavlja ga mešanica proteinov, izmed katerih večinski delež predstavlja kolagen tipa I. Osteoid z vezavo s hidroksiapatitom povzroči mineralizacijo kosti in ji da trdnost in togost. Skozi proces osteogeneze se osteoblasti ujamejo v osteoid in se po mineralizaciji preoblikujejo v osteocite. Osteoklasti so celice, ki sodelujejo v resorpciji kosti, nahajajo se na kostni površini v prostorih, imenovanih Howshipove lakune (30).

V kostnem tkivu (prav tako v zobeh) je DNA veliko bolj stabilna kot v ostalih tkivih. Kemp in Smith (32) sta zagovornika hipoteze, ki pravi, da omogoča stabilnost DNA in njeno ohranitev v starih skeletnih ostankih vezava DNA na hidroksiapatit, pri čemer se negativno nabite fosfatne skupine molekule DNA vežejo na hidroksilna mesta na hidroksiapatitu, ki je glavna kostna masa. To hipotezo potrjuje dejstvo, da se ob povečani degradaciji hidroksiapatita ohrani v kosti manj DNA. S časom je zaradi dejavnikov okolja kost vedno bolj porozna, kar zmanjša možnost pridobitve DNA (30). Prve uspešno izvedene preiskave DNA, pridobljene iz kosti, so opravili Hochmeister (33) in Hagelbergova (34), ki je pri molekularnoantropoloških preiskavah kosti, starih od 300 do 5.500 let, ugotovila, da je ohranjenost DNA v kosteh odvisna predvsem od pogojev, v katerih so se skeletni ostanki nahajali, manj pa od same starosti skeletnih ostankov. Za preiskavo DNA iz skeletnih ostankov se najpogosteje uporabljajo stegnenice, golenice, zobje ter skalnice senčnic (35-37), nekatere novejše raziskave pa kažejo velik potencial majhnih spongioznih kosti dlani in stopal ter pogačic (38,39). Metoda ekstrakcije DNA iz kosti je ena najzahtevnejših in najdaljših ekstrakcijskih metod v forenzičnih genetskih preiskavah. Svežih kosti za pridobitev genomske DNA ni potrebno prej dekalcificirati, pri starih kosteh pa nam dekalcifikacija omogoča pridobitev večje količine DNA (33).

5 Zobje

Za genetsko identifikacijo skeletiziranih, močno poškodovanih ali razpadlih človeških posmrtnih ostankov so zobje zelo dober, če ne celo najboljši vir DNA, saj so skriti v čeljustnih kosteh, dodatno pa jih ščitijo še jezik, lična sluznica in sklenina. V primerjavi s kostmi je DNA v zobeh bolj zaščitena, saj predstavljajo trda zobna tkiva, ki obdajajo pulpno votlino, fizično zaščito zobne pulpe. Trda zobna tkiva se ohranijo v številnih skrajnih okoliščinah, saj niso podvržena hitri razgradnji po zakopu in raztapljanju v vodi. Alvarez Garcia (40) je preučeval vpliv okolja na razgradnjo DNA v zobeh in ugotovil, da pride najhitreje do razgradnje DNA v vodi, nato v zemlji in nato na zraku. V starih zobeh je DNA izred-

no stabilna, saj je, podobno kot v starih kosteh, vezana na hidroksiapatit. Rubio s sodelavci (41) ugotavlja, da največ DNA v zobnih tkivih propade v prvih dveh letih po smrti.

Anatomsko lahko zob razdelimo na tri dele: krona, ki predstavlja zgornji del, in korenina, ki predstavlja spodnji z alveolno kostjo obdan del, ter vrat, ki predstavlja stičišče krone in korenine. Zunanjo plast krone prekriva sklenina, ki je najtrše tkivo v človeškem telesu. Skoraj v celoti je mineralnega izvora in ne vsebuje celic. Korenina zoba je prekrita s cementom, ki je mineralizirano tkivo, sestavljeno iz hidroksiapatita, kolagena in drugih nekolagenskih proteinov. Delimo ga v dve vrsti glede na prisotnost ali odsotnost celic (cementocitov) (42). Cement brez celic se nahaja v vratnem delu zobne korenine in povezuje zob z obzobnimi tkivi. Cement, ki vsebuje v medceličnino ujete celice, se nahaja v apikalnem delu zobne korenine in v furkacijskem področju zoba, tj. tam, kjer se razhajajo korenine večkoreninskih zob (43). Lahko ga primerjamo s kostnim tkivom, kjer so v lakunah ujeti osteociti, saj prav tako služi kot dober vir DNA, a je po svoji funkciji in strukturi drugačen; ni ožiljen, oživčen, ne vsebuje kostnega mozga, ni podvržen nenehnemu remodeliranju, v življenju posameznika pa se nenehno debeli (42,43). Na meji med krono in korenino – v področju, imenovanem zobni vrat – se stikata sklenina in cement, pod njima pa se nahaja zobovina (dentin), ki ščiti zobno pulpo. Zobovina in pulpa predstavljata glavnino zoba in sta v nasprotju s sklenino bogata s celicami, večinoma gre za odontoblaste in fibroblaste. Zobovino sestavljajo hidroksiapatit, kolagen tipa I in voda (42). Najbogatejši vir DNA v zobeh je zobna pulpa. Ta je v pulpni votlini dobro zaščitena, vse dokler je zob trdno zasidran v alveolni kosti. Če je zob shranjen v suhem okolju, pride do dehidriranja zobne pulpe in mumifikacije, kar zaustavi nekrotične in gnilobne procese in omogoča dobro ohranjenost DNA. Če je mikrookolje vlažno, pulpa hitro zgnije. Suho okolje in nižja temperatura v kombinaciji s kratkim posmrtnim intervalom so za ohranitev DNA v pulpi najugodnejši, v nasprotnem primeru pa se DNA ohrani v trdnih zobnih tkivih (42).V primerih, ko je posmrtni interval dolg in je verjetnost razgradnje zobne pulpe velika, lahko opravimo tipizacijo mtDNA, katere glavni vir je dentin – ostanki podaljškov odontoblastov v dentinskih kanalih pa tudi cementociti v cementu (44). Zunanje tkivo – sklenina ščiti tkiva, ki so v notranjosti zoba, pred zunanjimi dejavniki, kot so denimo UV sevanje, mikroorganizmi in višje temperature. Sklenina ima pore in je neprepustna za molekule, ki so večje od vode, ter tako ščiti zob tudi po smrti organizma. Pore v zobovini so manjše od por v kostnem tkivu, kar prispeva k boljši ohranjenosti zob v primerjavi s kostmi.

Na količino in kakovost DNA v zobu vplivajo tudi bolezni zob, hkrati pa slednje zvišajo možnosti kontaminacije. Pri kariesu mikroorganizmi lokalno razgradijo mineralizirano zobno tkivo, kar omogoči vdor bakterij v pulpo. V kombinaciji z napredovalo parodontozo lahko karies uniči zobni cement, saj je le-ta v tem primeru izpostavljen ustni votlini in tako dostopen mikroorganizmom (42). Higgins in sodelavci (45) s preučevanjem zobovine in zobnega cementa, kot dveh morebitnih najugodnejših virov DNA v zobeh, prihajajo do zaključkov, da obstaja razlika v količini DNA med zobmi iste osebe in med različnimi tkivi istega zoba. Pri vzorčenju priporočajo uporabo zdravih, endodontsko nezdravljenih zob, če takih ni na voljo, pa je DNA bolj smiselno pridobiti iz zobnega cementa v predelu korenine in ne iz celega

zoba (43). Za genetsko preiskavo si zobje po primernosti sledijo v naslednjem vrstnem redu: endodontsko nezdravljeni kočnik, ličnik, podočnik in sekalec. Pridobitev DNA iz zoba je mogoča bodisi z resekcijo zoba ter ekstrakcijo zobne pulpe, bodisi z zmletjem celega zoba ali pa z zmletjem le koreninskega dela, če ima zob karies (43).

6 Nohti

Nohti so se razvili le pri primatih in predstavljajo roženo tvorbo epidermisa kože. Epidermis v glavnem tvorijo keratinociti, ki izdelujejo vlaknasti protein keratin. V višje ležečih plasteh epidermisa se keratinociti spreminjajo v roževinaste luske. Poroženevanje ali keratinizacija je proces, v katerem se keratinociti postopno v različnih plasteh epidermisa izdiferencirajo v korneocite, izpolnjene s keratinom in drugimi beljakovinami. Keratinizacija se konča po kemičnih spremembah, katerih rezultat so disulfidne povezave keratinskih filamentov. Keratin kože imenujemo mehki keratin, keratin las in nohtov pa trdi keratin, ki za razliko od mehkega vsebuje veliko disulfidnih skupin. Mehki keratin se lušči, trdega pa je potrebno rezati (46). V primeru identifikacije močno razpadlega ali ekshumiranega trupla pridobimo genetski material, če je le možno, iz nohtov. Ti se, podobno kot lasje, ohranijo dolgo po smrti in so v naravnem okolju manj izpostavljeni mikrobni razgradnji, saj obstaja le nekaj specializiranih mikroorganizmov, ki lahko uporabljajo keratin kot hranilo (47). Najprimernejši so nohti na palcih nog, saj so najdebelejši (48). Za razliko od zob in kosti je postopek izolacije genomske DNA iz nohtov bistveno krajši in manj zahteven. Cline (49) je uspešno sekveniral do 270 bp dolge fragmente mtDNA iz nohtov, ekshumiranih 36 let po pokopu. Splošno velja, da je iz razmeroma svežih nohtov moč pridobiti jedrne profile, pri starih nohtih pa je večinoma uspešna analiza mtDNA. Če je noht nalakiran z lakom, je potrebno lak odstraniti, saj zavira reakcijo PCR (49). Večina standardnih metod za pridobitev DNA iz keratiniziranih tkiv (nohti in lasje) zahteva zaradi prisotnosti disulfidnih vezi med keratinskimi proteini večdnevno inkubacijo v ekstrakcijskem pufru, ki poleg proteinaze K vsebuje tudi DTT (ta cepi disulfidne vezi med polipeptidi). Za polno aktivnost proteinaze K je potrebna prisotnost ionov Ca^{2+}. Hellmann (50) je v TN_{Ca}-pufru EDTA zamenjal z ioni Ca^{2+} in dosegel popolno razgradnjo keratiniziranega nohta (ali lasnega stebla) že v 2–5 urah, zaradi česar je čas, potreben za pridobitev DNA iz nohtov (ali las), bistveno krajši kot iz kosti ali zob.

7 Lasje

Las je rožena, elastična tvorba epidermisa. V kožo je vložen v tulcu ali foliklu. Med nosečnostjo se pri embriju razvijejo vsi lasni folikli, iz katerih nato v življenju ciklično izraščajo in izpadajo lasje (22). V lasnem steblu sta dve populaciji mitohondrijev - ena iz matriksnih celic in druga iz melanocit. Posledica dveh populacij mitohondrijev je mešanje različnih genskih skladov molekul mtDNA, ki imajo lahko različne haplotipe in so torej potencialno heteroplazmični. Eno samo lasno steblo lahko ima vzdolž različnih delov stebla različna razmerja heteroplazmičnih variant oziroma so lahko različna razmerja heteroplazmičnih variant prisotna med lasmi, ki izvirajo iz istega folikla (22,51).

Lasje imajo tri faze rasti. Prva faza je anagena ali aktivna faza, v kateri so lasje 2 do 8 let. Sledi ji katagena ali razgrajevalna faza, ki traja 2 do 4 tedne (52). V tej prehodni fazi se zaključi mitotska aktivnost matriksnih celic lasnega folikla. Po

katageni fazi se lasje nahajajo 2 do 4 mesece v telogeni ali počivajoči fazi, dokler ne izpadejo iz lasišča. Začetek zadnje, telogene faze naznanja skrčitev lasne korenine in njeno potiskanje proti površini lasišča. Po delovanju proteinaz nastane v koži iz vidne čebulice lasne korenine nevidna paličasta korenina, bogata s keratini, povezanimi z disulfidnimi vezmi. Telogena korenina dosega le še 1/3 dolžine korenine v anageni fazi. V telogeni fazi pride do programirane celične smrti – apoptoze, katere rezultat je keratinizacija celičnih proteinov, razgradnja jedra in izguba oziroma razgradnja jedrne DNA. Pod telogeno korenino se začne tvoriti nov anageni las, telogeni pa izpade iz lasišča. Populacija matriksnih celic in dermalna papila za nov anageni las torej izvirata iz starega telogenega lasu, nov las pa se tvori na istem mestu, kot je stari izpadel. Telogeni folikel postane zopet anageni (22). Ko las izpade iz lasnega folikla, pride do dehidracije celic, zato popolnoma keratiniziran las vsebuje manj kot 10 % vode. Vsak dan nam izpade 50 do 100 telogenih las. Na lasišču imamo 100.000 do 150.000 las, od tega je 80 do 90 % anagenih in približno 10 % telogenih. Katagenih las je malo, saj traja katagena faza le 2 do 4 tedne (52). Pri anagenih in katagenih laseh se jedrna DNA nahaja v čebulici lasne korenine in celicah lasnega tulca, ki obkrožajo lasno korenino. Večino jedrne DNA vsebuje lasna korenina, lasni tulec je vsebuje zelo malo. Pred ekstrakcijo DNA iz las je nujno potrebno opraviti mikroskopsko analizo, saj je prisotnost jedrne DNA odvisna od morfologije lasu. Korenine anagenih in katagenih las so odlični kandidati za analizo jedrne DNA. Telogeni lasje imajo le nevidno paličasto, keratinizirano korenino in popolnoma keratinizirano lasno steblo (22). Zato je pri izpadlih – telogenih laseh, ki jih na kraju kaznivega dejanja kriminalisti najpogosteje najdejo, večinoma uspešna le analiza mtDNA (53).

V lasnem steblu so pigmentna zrnca melanina, ki določajo barvo las. Eumelanin je v rjavih in črnih laseh, feomelanin v rdečih in svetlih laseh. S standardnimi ekstrakcijskimi postopki melanina ne moremo ločiti od DNA in inhibira reakcijo PCR (54). Nekateri forenzični strokovnjaki (54) domnevajo, da pogosto šamponiranje in barvanje las negativno vplivata na količino izolirane DNA, vendar McNevin (55) negativnega učinka kozmetičnih sredstev ni opazil. Različni avtorji (50,54) poudarjajo pri preiskavah lasnih stebel potrebo po odstranjevanju površinske kontaminacije.

Malo je znanega o posmrtnih spremembah mtDNA v laseh. Če so poškodbe DNA podobne kot v drugih tkivih, lahko pričakujemo oksidativno in hidrolitično depurinacijo, hidrolitično deaminacijo in fragmentacijo, ki so posledica izpostavljenosti ionizirajočemu sevanju in UV – svetlobi (47). Graffy (53) v primerih identifikacije pogrešanih oseb, še posebno, če je bilo truplo najdeno nekaj mesecev ali let po smrti, priporoča izolacijo DNA iz kosti, tudi če so lasje ohranjeni, saj so analize starih las problematične, pogosto tudi neuspešne.

8 Feces

Človeško blato ali madeži človeškega blata na toaletnem papirju ali obleki so v redkih primerih edini dokazni material, najden na kraju kaznivega dejanja. Pri spolnih zlorabah je možno najti majhne količine blata na penisu posiljevalca. S tipizacijo DNA lahko ugotovimo izvor človeškega blata in osumljenca oziroma žrtev povežemo (ali ne) s kaznivim dejanjem.

Feces je končni produkt prebave, ki poteka v prebavilih. Ta je obložen z epi-

telom, ki se regenerira na dva do šest dni. Pri človeku se tako iz prebavil dnevno odlušči 17 milijard celic (56). Glede na to, da dnevno izločimo 100–200 gramov blata in da celica vsebuje približno 6 pg genomske DNA, lahko ocenimo, da miligram blata teoretično vsebuje 300–600 ng DNA. Vendar praktično iz fecesa pridobimo veliko manj DNA, saj večino odluščenih celic in njihove DNA v procesu prebave prebavni encimi in bakterije razgradijo. Intestinalno oblogo tvorijo stebričaste absorptivne celice in čašaste celice. V fecesu poleg teh dveh tipov epitelnih celic najdemo tudi luskaste celice iz epitela analnega kanala, ki se odluščijo ob iztiskanju blata. Levkocitov, ki so sicer prisotni v intestinalni oblogi, v fecesu običajno ne najdemo. Z mikroskopsko analizo blata so dokazali prisotnost nukleiranih odluščenih epitelnih celic, ki so v fecesu glavni vir DNA in nakazujejo možnost pridobitve jedrne DNA. Vendar vsebuje feces zelo veliko bakterij (v debelem črevesu in danki je 10^{11} bakterijskih celic na gram črevesne vsebine), ki degradirajo DNA, in ogromno snovi, ki inhibirajo reakcijo PCR (57).

Vsebnost DNA v fecesu ljudi močno variira in je individualno specifična, kar sta dokazala tako Jahnson (56) kot Vandenberg (58). Na koncentracijo iz fecesa izolirane DNA vplivajo količina blata in interval gibanja peristaltike, razgradnja odluščenih epitelnih celic in DNA v blatu, izpostavljenost blata zunanjim dejavnikom ter učinkovitost ekstrakcijske procedure. Tako je možno pridobiti največ genomske DNA iz svežega in zamrznjenega blata, z daljšanjem izpostavljenosti zunanjim dejavnikom pa se stopnjuje bakterijska razgradnja DNA in razgradnja zaradi razgrajevalnih snovi, ki se v človeškem blatu nahajajo (npr. žolčne kisline). Odluščene epitelne celice v fecesu niso enakomerno razporejene. Gibanje peristaltike povzroča mešanje črevesne vsebine, zato so vsi deli fecesa občasno izpostavljeni epitelni površini črevesa. Mešanje je manj intenzivno v rektumu in analnem kanalu, kjer pride ob iztiskanju do dodatnega luščenja epitelnih celic, zato so najverjetneje na površini blata večje količine epitelnih celic. Vandenberg (58) zato priporočata ekstrakcijo DNA iz blata, odvzetega iz površine.

9 Urin

V forenzični dejavnosti je urin zanimiv zlasti v primerih, ko je potrebno ugotoviti identiteto urina, prej odvzetega za forenzične toksikološke ali alkoholimetrične preiskave ter kontrole dopinga (59). V teh primerih se namreč lahko pojavi sum, da urin ne pripada preiskovancu (ali so ga preiskovanci zamenjali že v ambulanti pri samem odvzemu vzorca, ali pa je prišlo do zamenjave vzorcev ob analizi v laboratoriju). Preverjanje izvora urinskega vzorca ni preprosto, saj ima urin v primerjavi z ostalimi telesnimi tekočinami zelo malo celic. V zdravem človeškem urinu najdemo le do 500 nukleiranih celic na mililiter urina. Največ je levkocitov (300–500 celic/ml urina), v majhnem številu pa so prisotne tudi epitelne celice (60). Urin žensk vsebuje večje število nukleiranih celic (zlasti epitelne celice iz nožničnega trakta) kot urin moških, zato običajno pridobimo petkrat več DNA iz urina žensk (61). Proces hidrolize celic v urinu in kontaminacije z mikroorganizmi (bakterije, glive) nastopi praktično takoj po uriniranju, zato je dobro svežemu urinu pred shranjevanjem dodati snovi, ki preprečijo rast mikroorganizmov, zmanjšajo aktivnost encimov in stabilizirajo DNA. Različni avtorji predlagajo uporabo različnih prezervativov in shranjevanje vzorcev pri različnih temperaturah (62). Količina genomske DNA, ki jo je moč pridobiti iz

vzorca urina, je odvisna od spola, od pogojev, v katerih so urin shranili, od časa shranjevanja, od obsežnosti mikrobne kontaminacije, od sproščanja nukleaz iz hidroliziranih celic in od metode izolacije, ki jo uporabimo za pridobitev DNA (62). Če tipizacija jedrne DNA ni uspešna, tipiziramo mtDNA.

10 Ukrepi za preprečevanje kontaminacije DNA

Kemijski dejavniki okolja (čas, sončna svetloba, temperatura, vlažnost…) in biološki dejavniki okolja (prisotnost mikroorganizmov), kateremu so človeški posmrtni ostanki ali človeški izločki podvrženi, povzročajo razgradnjo genetskega materiala in kontaminacijo z DNA bakterij in gliv. Najslabše vpliva na človeški dedni material izpostavljenost visokim temperaturam, visoki vlažnosti in neposredni sončni svetlobi ter mikroorganizmom, ki s svojimi encimi cepijo molekulo DNA (na mikrobno razgradnjo v največji meri vpliva vlaga). Tovrstne kontaminacije, ki v največji meri vpliva na uspešnost tipizacije mtDNA, ne moremo preprečiti. Preprečimo pa lahko najnevarnejši tip kontaminacije, to je kontaminacija s človeškim biološkim materialom oziroma sodobno človeško DNA. Zaradi nizke vsebnosti DNA in njene razgrajenosti v starih ali slabo ohranjenih bioloških materialih so tovrstni forenzični vzorci zelo dovzetni za kontaminacijo s sodobno DNA (32), do katere lahko pride pri zbiranju in shranjevanju dokaznega materiala ali med samo tipizacijo v laboratoriju. Pri starih kosteh, zobeh in telogenih laseh je najpogostejša površinska kontaminacija zaradi neprimernega rokovanja z dokaznim materialom. Površinsko kontaminacijo odstranjujemo z različnimi metodami. Med njimi so najpogostejše spiranje v vodi, detergentu, kislini, etanolu ali belilu, obsevanje z UV-svetlobo, pri kosteh fizično odstranjevanje površine in kot zadnja možnost pridobitev DNA iz materiala, odvzetega iz notranjosti kosti ali zoba. Za učinkovito odstranevanje površinske kontaminacije se običajno uporablja različna kombinacija naštetih tehnik.

Uporabo belila (natrijev hipoklorit) kot sredstva za odstranjevanje kontaminacije iz površine starih kosti ali zob je preučeval Kemp (32) in ugotovil, da belilo uniči kontaminacijsko DNA na površini kosti ali zob, saj jo z oksidativnim delovanjem razcepi na kratke fragmente, endogena DNA pa ostane nepoškodovana. Vzrok za to je izredna stabilnost DNA, ki se v starih kosteh in zobeh veže na hidroksiapatit, ki jo ščiti pred kemijsko razgradnjo. Belilo je potrebno nato odstraniti s spiranjem z vodo in etanolom. Pri zobeh je zobna pulpa, ki je glavni vir DNA, zaprta v pulpni votlini in obdana s trdimi tkivi (sklenina, dentin in cement), zato je manj izpostavljena kontaminaciji (63). Večina raziskovalcev (54) uporablja za dekontaminacijo površine zob podobno kot pri kosteh zaporedno spiranje v detergentu, vodi in etanolu ter obsevanje z UV-svetlobo. Če je zob poškodovan (zlomljen ali prizadet z zobno gnilobo) njegovo površino dekontaminiramo le s spiranjem v vodi in obsevanjem z UV-svetlobo (54). Površina lasnega stebla je zaradi hidrofobne narave keratinskih proteinov vodoodporna in zato na nek način zaščitena pred kontaminacijo, če pa že pride do nje, se jo da sprati z zaporednim večkratnim spiranjem v detergentu, etanolu in vodi (53,54). Cline (49) opozarja, da lahko uporaba previsokih koncentracij belila (10-odstotno belilo), kislin (1N HCl) in ekstrakcijskih pufrov (z dodano proteinazo K in SDS) kot sredstev za odstranjevanje površinske kontaminaci-

je iz nohtov poškoduje endogeno DNA nohta.

Poleg površinske kontaminacije s sodobno DNA je možna še kontaminacija s predhodnimi produkti reakcije PCR ali kontaminacija reagentov, plastike in druge laboratorijske opreme. V Laboratoriju za molekularno genetiko Inštituta za sodno medicino v Ljubljani zato v izogib kontaminaciji vedno sledimo priporočilom za njeno preprečevanje (13,19,32,64,65). Uporabljamo dvojne sterilne laboratorijske rokavice, ki jih za vsak vzorec menjamo, kirurške maske za obraz, zaščitne kape, zaščitne prevleke za čevlje in zaščitno haljo za enkratno uporabo. Vse delovne površine pred in po delu očistimo z belilom, vodo in etanolom. Če je možno, jih čez noč izpostavimo tudi UV-sevanju. Orodja in pripomočke za čiščenje, brušenje in mletje kosti in zob po uporabi očistimo na enak način kot delovne površine, jih steriliziramo in čez noč ter pred začetkom dela izpostavimo UV-sevanju. Na enak način po sterilizaciji čez noč in pred začetkom dela UV-sevanju izpostavimo vse pripomočke, orodja, reagente in laboratorijsko plastiko. Za vsak vzorec uporabimo nova, čista orodja in pripomočke. Izdelano imamo eliminacijsko podatkovno zbirko DNA, v kateri so shranjeni profili mtDNA laboratorijskega osebja in oseb, ki so v kateri koli fazi zbiranja in shranjevanja forenzičnih vzorcev – zlasti skeletnih ostankov, prišle v stik z njimi. Vzorce eliminacijske zbirke analiziramo ločeno od forenzičnih vzorcev in ločeno od referenčnih vzorcev (sorodniki ali osebni predmeti pogrešane osebe pri identifikacijskih postopkih). Prostorsko med seboj ločimo različne dele analize, da preprečimo morebitno kontaminacijo s produkti PCR. Pomnoženih produktov PCR nikoli ne vnašamo v prostore za pripravo vzorcev in reagentov, izolacijo DNA in pripravo reakcij PCR; slednji so med seboj prav tako ločeni. Čiščenje in mletje kosti in zob poteka v popolnoma ločenem prostoru, kjer mehansko čistimo vzorce kosti v zaprti citostatični komori, da preprečimo navzkrižno kontaminacijo vzorcev s kostnim prahom. Ta prostor uporabljamo zgolj za pripravo tovrstnih vzorcev (kosti, zobje, telogeni lasje, stari nohti), ne pa tudi za pripravo vzorcev, ki vsebujejo večje količine DNA, kot denimo vzorci krvi in sline. V pomnoževanje produktov z reakcijo PCR vedno vključimo negativno kontrolo, da zaznamo kakršno koli kontaminacijo z DNA ali s produkti PCR. Prav tako vedno vključimo negativno kontrolo v postopek ekstrakcije DNA, da preverimo čistost ekstrakcijskih reagentov, laboratorijske plastike in morebitno navzkrižno kontaminacijo vzorcev. Dobljena nukleotidna zaporedja forenzičnih vzorcev primerjamo z eliminacijsko podatkovno zbirko profilov mtDNA. MtDNA vedno sekveniramo v obe smeri, s čimer zagotovimo pravilnost določitve nukleotidnega zaporedja. Preiskave forenzičnih vzorcev, ki vsebujejo nizke količine mtDNA, ponovimo vsaj dvakrat – tako preverimo, ali dobljeni rezultati med seboj sovpadajo (66).

11 Primeri preiskav mtDNA

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 (3). Tako so s tipizacijo mtDNA identificirali francoskega prestolonaslednika Ludvika XVII, katerega srce je po usmrtitvi izrezal zdravnik in se je ohranilo vse do danes. Iz preko 200 let starega srca pridobljeni haplotip mtDNA so primerjali s haplotipom mtDNA las Marije Antoinette in njenih še živečih potom-

cev 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 (67). 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 (68). S tipizacijo jedrne in mtDNA so identificirali brata Reinholda Messnerja (69) ter leta 1960 pokopane člane gverilske organizacije Che Guevara v Boliviji (70). Velikokrat se uporablja kombinacija jedrnih in mtDNA polimorfizmov za identificiranje žrtev množičnih nesreč, kot so letalske nesreče, potresi in požari (71). Ena najbolj odmevnih molekularnogenetskih identifikacij skeletnih ostankov je bila identifikacija ruske vladarske družine Romanov (26,27), 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 posmrtne ostanke družine Romanov. Jedrna DNA namreč omogoča le preverjanje bližnjih sorodstvenih odnosov, preverjanje sorodnosti med daljnimi sorodniki, ki so med seboj ločeni z nekaj generacijami pa zaradi rekombinacije ni mogoče. Preverjanje daljnih sorodstvenih povezav je možno z analizo linearnih genetskih označevalcev, kot sta kromosom Y in mtDNA, saj se dedujeta v nespremenjeni obliki. Pri družini Romanov so preverili identičnost skeletnih ostankov tako, da so nukleotidna zaporedja mtDNA primerjali z nekaj generacij oddaljenimi, a še živečimi potomci po materini liniji. Molekularnogenetske analize 5.000 let starega tirolskega ledenega človeka – Ötzija (72), neandertalca (73) in mnoge druge genetske analize starodavne DNA so pokazale, da je možno pridobiti mtDNA iz zelo starih človeških ostankov, ne le skeletov, ampak tudi mumificiranih mehkih tkiv različnih muzejskih in arheoloških zbirk (3).

S pomočjo mtDNA poteka identifikacija skeletnih ostankov ameriških vojakov, padlih v vojnah v Vietnamu, Kambodži, Laosu in na Kitajskem (2300 žrtev), v korejski vojni (8.000 žrtev) in v drugi svetovni vojni (78.000 vojakov) (11) ter identifikacija žrtev množičnih pobojev na ozemlju bivše Jugoslavije (100.000 žrtev) (74,75). MtDNA je izredno uporabna pri identifikaciji žrtev druge svetovne vojne v Sloveniji, kjer imamo preko 600 evidetiranih prikritih grobišč s približno 100.000 žrtvami. Največje prikrito masovno grobišče, ki smo ga v Sloveniji genetsko identificirali, je grobišče Konfin I v bližini Grčaric (76). Seznam žrtev, najden v arhivih, je zajemal 88 žrtev, antropološka študija izkopanih skeletov je to število potrdila. Še živeče sorodnike (brate, sestre, sinove, hčerke, nečakinje, nečake, bratrance) smo uspeli najti za 44 žrtev. Izkop v anatomski legi ni bil mogoč, zato smo genetsko preiskali vse desne stegnenice (84 kosti) ter pridobili jedrno DNA za uspešno tipizacijo mikrosatelitov iz 82 kosti, pri čemer smo s primerjavo genetskih profilov avtosomskih mikrosatelitov ter haplotipov kromosoma Y in mtDNA s sorodniki uspeli identificirati tretjino žrtev, statistične analize pa so pokazale visoko stopnjo identifikacije za 32 žrtev (76). Haplotipi mtDNA so nam služili za identificiranje s pomočjo sorodnikov po materini liniji. Kosti smo vrnili sorodnikom, ki so svojce pokopali v družinske grobove. Identifikacija žrtev druge svetovne vojne je zelo kompleksen proces, saj vključuje sodelovanje strokovnjakov različnih področij, genetska tipizacija je težavna zaradi slabo ohranjene DNA v starih

kosteh, problematično pa je tudi iskanje sorodnikov, saj je od vojnih pobojev minilo več kot 70 let. Dokazali smo, da lahko s kombinacijo različnih genetskih označevalcev (avtosomske DNA, kromosoma Y in mtDNA) in tipizacijo bližnjih in daljnih sorodnikov ter izredno uspešno metodo ekstrakcije DNA iz skeletnih ostankov, ki smo jo razvili v našem laboratoriju (66), uspešno identificiramo tudi žrtve druge svetovne vojne. Identifikacija žrtev masovnega grobišča Konfin I je postavila osnovo za nadaljnje molekularnogenetske preiskave povojnih množičnih grobišč, ki smo jih v zadnjih desetih letih izvedli v Sloveniji v našem laboratoriju. Poleg storžiških žrtev (77) smo genetsko preiskali tudi žrtve Bodoveljske Grape (5), lobanjo iz Bohinja (78), žrtve grobišča Mačkovec (prispevek v postopku recenzije), Mače (prispevek v pripravi), Babna Gora (prispevek v postopku recenzije), Mozelj, Kržeti, Zaplana, Krimska jama in Konfin II.

12 Zaključek

Preiskave mtDNA v forenzični dejavnosti so izredno pomembne za reševanje primerov, pri katerih preiskava jedrne DNA ni uspešna, ter primerov identifikacij, pri katerih imamo za primerjavo kot referenčni vzorec na razpolago le sorodnike po materini liniji. Le malo evropskih laboratorijev je v preteklosti uporabljalo preiskave mtDNA, saj je postopek Sangerjevega sekveniranja in ločevanja sekvenčnih produktov na kapilarni elektroforezi zamuden, mtDNA pa je zaradi številnih kopij močno izpostavljena kontaminaciji, kar je potrebno upoštevati pri organizaciji in opremi forenzičnega genetskega laboratorija, postopki pa v nasprotju s preiskavami jedrnih mikrosatelitov niso standardizirani. Z razvojem tehnologije sekveniranja naslednje generacije (*angl.* Next Generation Sequencing, NGS) postaja tipizacija mtDNA v forenziki hitrejša, enostavnejša, uporabniku prijaznejša, zaradi zaprtih sistemov manj podvržena kontaminaciji in standardizirana. Tako lahko danes s tehnologijo NGS na enostaven način sekveniramo ne le kontrolno regijo mtDNA, ampak tudi celoten mitohondrijski genom (51,79,80).

13 Zahvala

Zahvaljujem se Komisiji Vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč za opravljene izkope žrtev druge svetovne vojne.

Del študij, opisanih v preglednem članku je sofinancirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) iz državnega proračuna (projekt Določitev najprimernejših skeletnih elementov za molekularno genetsko identifikacijo starih človeških posmrtnih ostankov, št. J3–8214).

Literatura

1. Zupanič Pajnič I, Šterlinko H, Bala ic 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(3):178–80. https://doi.org/10.1007/s004140000179 PMID:11296891
2. Zupanič Pajnič I, Balažic J, Komel R. Sequence polymorphism of the mitochondrial DNA control region in the Slovenian population. Int J Legal Med. 2004 Feb;118(1):1–4. https://doi.org/10.1007/s00414-003-0394-3 PMID:14534795
3. Fisher DL, Holland MM, Mitchell L, Sledzik PS, Wilcox AW, Wadhams M, et al. Extraction, evaluation, and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States Civil War bone. J Forensic Sci. 1993 Jan;38(1):60–8. https://doi.org/10.1520/JFS13376J PMID:8426158

4. Coble MD, Vallone PM, Just RS, Diegoli TM, Smith BC, Parsons TJ. Effective strategies for forensic analysis in the mitochondrial DNA coding region. Int J Legal Med. 2006 Jan;120(1):27–32. https://doi.org/10.1007/s00414-005-0044-z PMID:16261373
5. Zupanič Pajnič I. Identifikacija oseb iz starih in slabo ohranjenih bioloških materialov s polimorfizmi mitohondrijske DNA [PhD Thesis]. Ljubljana: I. Zupanič Pajnič; 2007.
6. Obal M. Uporaba različnih skeletnih elementov za genetsko identifikacijo žrtev druge svetovne vojne [Master's Thesis]. Ljubljana: M. Obal; 2018.
7. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. 1981 Apr;290(5806):457–65. https://doi.org/10.1038/290457a0 PMID:7219534
8. Vogel F, Motulsky AG. Human genetics - problems and approaches, Springer-Verlag, Berlin, 1997: p. 83–87, 114–127, 145–193, 495–582, 593–594, 602–604, 610–621, 705–711. https://doi.org/10.1007/978-3-540-37654-5
9. Bendall KE, Macaulay VA, Sykes BC. Variable levels of a heteroplasmic point mutation in individual hair roots. Am J Hum Genet. 1997 Dec;61(6):1303–8. https://doi.org/10.1086/301636 PMID:9399894
10. Howell N, Kubacka I, Mackey DA. How rapidly does the human mitochondrial genome evolve? Am J Hum Genet. 1996 Sep;59(3):501–9. PMID:8751850
11. Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, Rodriquez WC, Canik JJ, Merril CR, et al. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam War. J Forensic Sci. 1993 May;38(3):542–53. https://doi.org/10.1520/JFS13439J PMID:8515208
12. Hopwood AJ, Mannucci A, Sullivan KM. DNA typing from human faeces. Int J Legal Med. 1996;108(5):237–43. https://doi.org/10.1007/BF01369817 PMID:8721422
13. Tully G, Bär W, Brinkmann B, Carracedo A, Gill P, Morling N, et al. Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices, nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. Forensic Sci Int. 2001 Dec;124(1):83–91. https://doi.org/10.1016/S0379-0738(01)00573-4 PMID:11741765
14. Sullivan KM, Hopgood R, Gill P. Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA. Int J Legal Med. 1992;105(2):83–6. https://doi.org/10.1007/BF02340829 PMID:1520642
15. 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(2):85–90. https://doi.org/10.1007/BF01225046 PMID:8217870
16. Lutz S, Wittig H, Weisser HJ, Heizmann J, Junge A, Dimo-Simonin N, et al. Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? Forensic Sci Int. 2000 Sep;113(1-3):97–101. https://doi.org/10.1016/S0379-0738(00)00222-X PMID:10978608
17. Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. Nature. 1987 Jan;325(6099):31–6. https://doi.org/10.1038/325031a0 PMID:3025745
18. Lorente JA, Entrala C, Alvarez JC, Lorente M, Arce B, Heinrich B, et al. Social benefits of non-criminal genetic databases: missing persons and human remains identification. Int J Legal Med. 2002 Jun;116(3):187–90. https://doi.org/10.1007/s004140100255 PMID:12111326
19. Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Holland M, et al. DNA commission of the International society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. Int J Legal Med. 2000;113(4):193–6. https://doi.org/10.1007/s004140000149 PMID:10929233
20. Allen M, Engström AS, Meyers S, Handt O, Saldeen T, von Haeseler A, et al. Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities. J Forensic Sci. 1998 May;43(3):453–64. https://doi.org/10.1520/JFS16169J PMID:9608683
21. Parson W, Brandstätter A, Alonso A, Brandt N, Brinkmann B, Carracedo A, et al. The EDNAP mitochondrial DNA population database (EMPOP) collaborative exercises: organisation, results and perspectives. Forensic Sci Int. 2004 Jan;139(2-3):215–26. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2003.11.008 PMID:15040920
22. Linch CA, Whiting DA, Holland MM. Human hair histogenesis for the mitochondrial DNA forensic scientist. J Forensic Sci. 2001 Jul;46(4):844–53. https://doi.org/10.1520/JFS15056J PMID:11451065
23. Wilson MR, Polanskey D, Replogle J, DiZinno JA, Budowle B. A family exhibiting heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region reveals both somatic mosaicism and pronounced segregation of mitotypes. Hum Genet. 1997 Aug;100(2):167–71. https://doi.org/10.1007/s004390050485 PMID:9254844
24. Tully G, Barritt SM, Bender K, Brignon E, Capelli C, Dimo-Simonin N, et al. Results of a collaborative study of the EDNAP group regarding mitochondrial DNA heteroplasmy and segregation in hair shafts. Forensic Sci Int. 2004 Feb;140(1):1–11. https://doi.org/10.1016/S0379-0738(03)00181-6 PMID:15013160
25. Calloway CD, Reynolds RL, Herrin GL Jr, Anderson WW. The frequency of heteroplasmy in the HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age. Am J Hum Genet. 2000 Apr;66(4):1384–97. https://doi.org/10.1086/302844 PMID:10739761
26. Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, et al. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. Nat Genet. 1994 Feb;6(2):130–5. https://doi.org/10.1038/ng0294-130 PMID:8162066
27. Ivanov PL, 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. Nat Genet. 1996 Apr;12(4):417–20. https://doi.org/10.1038/ng0496-417 PMID:8630496
28. Parsons TJ, Muniec DS, Sullivan K, Woodyatt N, Alliston-Greiner R, Wilson MR, et al. A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. Nat Genet. 1997 Apr;15(4):363–8. https://doi.org/10.1038/ng0497-363 PMID:9090380

29. Bendall KE, Macaulay VA, Baker JR, Sykes BC. Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. Am J Hum Genet. 1996 Dec;59(6):1276–87. PMID:8940273
30. Campos PF, Craig OE, Turner-Walker G, Peacock E, Willerslev E, Gilbert MT. DNA in ancient bone - where is it located and how should we extract it? Ann Anat. 2012 Jan;194(1):7–16. https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.07.003 PMID:21855309
31. Allen C, Harper V. Laboratory Manual for Anatomy and Physiology. 4th ed. Hoboken (NJ): Wiley; 2011. p. 96–8.
32. Kemp BM, Smith DG. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. Forensic Sci Int. 2005 Nov;154(1):53–61. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.11.017 PMID:16182949
33. Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Eggmann U, Comey CT, Dirnhofer R. Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. J Forensic Sci. 1991 Nov;36(6):1649–61. https://doi.org/10.1520/JFS13189J PMID:1685164
34. Hagelberg E, Sykes B, Hedges R. Ancient bone DNA amplified. Nature. 1989 Nov;342(6249):485. https://doi.org/10.1038/342485a0 PMID:2586623
35. Miloš A, Selmanović A, Smajlović L, Huel RL, Katzmarzyk C, Rizvić A, et al. Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. Croat Med J. 2007 Aug;48(4):486–93. PMID:17696303
36. Hansen HB, Damgaard PB, Margaryan A, Stenderup J, Lynnerup N, Willerslev E, et al. Comparing Ancient DNA Preservation in Petrous Bone and Tooth Cementum. PLoS One. 2017 Jan;12(1):e0170940. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170940 PMID:28129388
37. Siriboonpiputtana T, Rinthachai T, Shotivaranon J, Peonim V, Rerkamnuaychoke B. Forensic genetic analysis of bone remain samples. Forensic Sci Int. 2018 Mar;284:167–75. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.12.045 PMID:29408726
38. Mundorff A, Davoren JM. Examination of DNA yield rates for different skeletal elements at increasing post mortem intervals. Forensic Sci Int Genet. 2014 Jan;8(1):55–63. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.08.001 PMID:24315589
39. Andronowski JM, Mundorff AZ, Pratt IV, Davoren JM, Cooper DM. Evaluating differential nuclear DNA yield rates and osteocyte numbers among human bone tissue types: A synchrotron radiation micro-CT approach. Forensic Sci Int Genet. 2017 May;28:211–8. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.03.002 PMID:28315820
40. Alvarez García A, Muñoz I, Pestoni C, Lareu MV, Rodríguez-Calvo MS, Carracedo A. Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp. Int J Legal Med. 1996r;109(3):125–9. https://doi.org/10.1007/BF01369671 PMID:8956985
41. Rubio L, Martinez LJ, Martinez E, Martin de las Heras S. Study of short- and long-term storage of teeth and its influence on DNA. J Forensic Sci. 2009 Nov;54(6):1411–3. https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01159.x PMID:19804532
42. Higgins D, Austin JJ. Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: a review. Sci Justice. 2013 Dec;53(4):433–41. https://doi.org/10.1016/j.scijus.2013.06.001 PMID:24188345
43. Mansour H, Krebs O, Sperhake JP, Augustin C, Koehne T, Amling M, et al. Cementum as a source of DNA in challenging forensic cases. J Forensic Leg Med. 2018 Feb;54:76–81. https://doi.org/10.1016/j.jflm.2017.12.015 PMID:29328966
44. Smith BC, Fisher DL, Weedn VW, Warnock GR, Holland MM. A systematic approach to the sampling of dental DNA. J Forensic Sci. 1993 Sep;38(5):1194–209. https://doi.org/10.1520/JFS13524J PMID:8228888
45. Higgins D, Kaidonis J, Austin J, Townsend G, James H, Hughes T. Dentine and cementum as sources of nuclear DNA for use in human identification. Aust J Forensic Sci. 2011;43(4):287–95. https://doi.org/10.1080/00450618.2011.583278.
46. Petrovič D, Zorc M. Histologija, Univerza v Ljubljani Medicinska fakulteta Inštitut za histologijo in embriologijo, Ljubljana, 2005. p. 35–42, 115–23, 166–68.
47. Gilbert MT, Janaway RC, Tobin DJ, Cooper A, Wilson AS. Histological correlates of post mortem mitochondrial DNA damage in degraded hair. Forensic Sci Int. 2006 Jan;156(2-3):201–7. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.02.019 PMID:15922527
48. Schlenker A, Grimble K, Azim A, Owen R, Hartman D. Toenails as an alternative source material for the extraction of DNA from decomposed human remains. Forensic Sci Int. 2016 Jan;258:1–10. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.10.025 PMID:26610200
49. Cline RE, Laurent NM, Foran DR. The fingernails of Mary Sullivan: developing reliable methods for selectively isolating endogenous and exogenous DNA from evidence. J Forensic Sci. 2003 Mar;48(2):328–33. https://doi.org/10.1520/JFS2002107 PMID:12664990
50. Hellmann A, Rohleder U, Schmitter H, Wittig M. STR typing of human telogen hairs—a new approach. Int J Legal Med. 2001;114(4-5):269–73. https://doi.org/10.1007/s004140000175 PMID:11355409
51. Gallimore JM, McElhoe JA, Holland MM. Assessing heteroplasmic variant drift in the mtDNA control region of human hairs using an MPS approach. Forensic Sci Int Genet. 2018 Jan;32:7–17. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.09.013 PMID:29024924
52. Linch CA, Smith SL, Prahlow JA. Evaluation of the human hair root for DNA typing subsequent to microscopic comparison. J Forensic Sci. 1998 Mar;43(2):305–14. https://doi.org/10.1520/JFS16137J PMID:9544538
53. Graffy EA, Foran DR. A simplified method for mitochondrial DNA extraction from head hair shafts. J Forensic Sci. 2005 Sep;50(5):1119–22. https://doi.org/10.1520/JFS2005126 PMID:16225218

54. Baker LE, McCormick WF, Matteson KJ. A silica-based mitochondrial DNA extraction method applied to forensic hair shafts and teeth. J Forensic Sci. 2001 Jan;46(1):126–30. https://doi.org/10.1520/JFS14923J PMID:11210897
55. McNevin D, Wilson-Wilde L, Robertson J, Kyd J, Lennard C. Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair. Part 2. An optimised genomic DNA extraction procedure reveals donor dependence of STR profiles. Forensic Sci Int. 2005 Oct;153(2-3):247–59. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.05.005 PMID:15998572
56. Johnson DJ, Martin LR, Roberts KA. STR-typing of human DNA from human fecal matter using the QIAGEN QIAamp stool mini kit. J Forensic Sci. 2005 Jul;50(4):802–8. https://doi.org/10.1520/JFS2004428 PMID:16078481
57. Roy R. Analysis of human fecal material for autosomal and Y chromosome STRs. J Forensic Sci. 2003 Sep;48(5):1035–40. https://doi.org/10.1520/JFS2002348 PMID:14535665
58. Vandenberg N, van Oorschot RA. Extraction of human nuclear DNA from feces samples using the QIAamp DNA Stool Mini Kit. J Forensic Sci. 2002 Sep;47(5):993–5. https://doi.org/10.1520/JFS15502J PMID:12353586
59. Sípoli Marques MA, Pinto Damasceno LM, Gualberto Pereira HM, Caldeira CM, Pereira Dias BF, de Giacomo Vargens D, et al. DNA typing: an accessory evidence in doping control. J Forensic Sci. 2005 May;50(3):587–92. PMID:15932091
60. Tsongalis GJ, Anamani DE, Wu AH. Identification of urine specimen donors by the PM+DQA1 amplification and typing kit. J Forensic Sci. 1996 Nov;41(6):1031–4. https://doi.org/10.1520/JFS14043J PMID:8914292
61. Linfert DR, Wu AH, Tsongalis GJ. The effect of pathologic substances and adulterants on the DNA typing of urine. J Forensic Sci. 1998 Sep;43(5):1041–5. https://doi.org/10.1520/JFS14354J PMID:9729822
62. Milde A, Haas-Rochholz H, Kaatsch HJ. Improved DNA typing of human urine by adding EDTA. Int J Legal Med. 1999;112(3):209–10. https://doi.org/10.1007/s004140050237 PMID:10335891
63. Tsuchimochi T, Iwasa M, Maeno Y, Koyama H, Inoue H, Isobe I, et al. Chelating resin-based extraction of DNA from dental pulp and sex determination from incinerated teeth with Y-chromosomal alphoid repeat and short tandem repeats. Am J Forensic Med Pathol. 2002 Sep;23(3):268–71. https://doi.org/10.1097/00000433-200209000-00013 PMID:12198355
64. Rohland N, Hofreiter M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. Nat Protoc. 2007;2(7):1756–62. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.247 PMID:17641642
65. Parson W, Gusmão L, Hares DR, Irwin JA, Mayr WR, Morling N, et al. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. Forensic Sci Int Genet. 2014;13:134–42. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.07.010 PMID:25117402
66. Zupanič Pajnič I. Extraction of DNA from Human Skeletal Material. In: Goodwin W: Forensic DNA Typing Protocols. Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York, NY, 2016;1420:89-108.
67. Jehaes E, Decorte R, Peneau A, Petrie JH, Boiry PA, Gilissen A, et al. Mitochondrial DNA analysis on remains of a putative son of Louis XVI, King of France and Marie-Antoinette. Eur J Hum Genet. 1998 Jul-Aug;6(4):383–95. https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200227 PMID:9781047
68. 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(3):194–6. https://doi.org/10.1007/s004140000176 PMID:11296895
69. Parson W, Brandstätter A, Niederstätter H, Grubwieser P, Scheithauer R. Unravelling the mystery of Nanga Parbat. Int J Legal Med. 2007 Jul;121(4):309–10. https://doi.org/10.1007/s00414-006-0098-6 PMID:16673142
70. Lleonart R, Riego E, Saínz de la Peña MV, Bacallao K, Amaro F, Santiesteban M, et al. 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(2):98–101. https://doi.org/10.1007/PL00007716 PMID:10741484
71. 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 Sep;113(1-3):79–85. https://doi.org/10.1016/S0379-0738(00)00219-X PMID:10978605
72. Handt O, Richards M, Trommsdorff M, Kilger C, Simanainen J, Georgiev O, et al. Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. Science. 1994 Jun;264(5166):1775–8. https://doi.org/10.1126/science.8209259 PMID:8209259
73. Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Pääbo S. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. Cell. 1997 Jul;90(1):19–30. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80310-4 PMID:9230299
74. Andelinović S, Sutlović D, Erceg Ivkosić I, Škaro V, Ivkosić A, Paić F, et al. Twelve-year experience in identification of skeletal remains from mass graves. Croat Med J. 2005 Aug;46(4):530–9. PMID:16100755
75. Parsons TJ, Huel RM, Bajunović Z, Rizvić A. Large scale DNA identification: the ICMP experience. Forensic Sci Int Genet. 2019 Jan;38:236–44. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.11.008 PMID:30469017
76. 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 Jul;124(4):307–17. https://doi.org/10.1007/s00414-010-0431-y PMID:20217112
77. Zupanič Pajnič I. Molecular genetic identification of the Slovene home guard victims [in Slovenian]. Zdrav Vestn. 2008;77(11):745–50.
78. Zupanič Pajnič I, Petaros A, Balažic J, Geršak K. Searching for the mother missed since the Second World War. J Forensic Leg Med. 2016 Nov;44:138–42. https://doi.org/10.1016/j.jflm.2016.10.015 PMID:27810583

79. Strobl C, Eduardoff M, Bus MM, Allen M, Parson W. Evaluation of the precision ID whole MtDNA genome panel for forensic analyses. Forensic Sci Int Genet. 2018 Jul;35:21–5. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.03.013 PMID:29626805
80. Sturk-Andreaggi K, Peck MA, Boysen C, Dekker P, McMahon TP, Marshall CK. AQME: A forensic mitochondrial DNA analysis tool for next-generation sequencing data. Forensic Sci Int Genet. 2017 Nov;31:189–97. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.09.010 PMID:29080494