

Strokovni prispevek/Professional article

**MOLEKULARNOGENETSKA IDENTIFIKACIJA DOMOBRANSKIH ŽRTEV**

## MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION OF THE SLOVENE HOME GUARD VICTIMS

*Irena Zupanič Pajnič*

Inštitut za sodno medicino, Medicinska fakulteta, Korytkova 2, 1000 Ljubljana

**Izvleček**

- Izhodišča** *V prispevku so opisane molekularnogenetske metode, ki smo jih uporabili za identifikacijo skeletnih ostankov treh žrtev povojnih pobojev pod Storžičem. Za preiskave smo uporabili stegnenice in zobe, katerih genetske profile smo primerjali s še živečimi sorodniki.*
- Metode** *Kosti in zobe smo očistili, odstranili površinsko kontaminacijo in zmleli v prah ter genomsko DNK ekstrahirali v napravi Biorobot EZ1 (Qiagen), s predhodno dekalifikacijo. Jedrno DNK vzorcev smo kvantificirali z metodo kvantitativne reakcije PCR v realnem času. Pridobili smo autosomske genetske profile ter haplotipe kromosoma Y in mtDNK vseh kosti in zob ter vseh referenčnih oseb. Z namenom sledljivosti v primeru pojava kontaminacije smo pripravili eliminacijsko podatkovno zbirko, ki je vsebovala genetske profile jedrne in mtDNK vseh oseb, ki smo bile kakor koli v stiku s skeletnimi ostanki.*
- Rezultati** *Iz stegnenic smo pridobili do 8,6 ng DNK/g kosti in iz zob do 55 ng DNK/g zoba. Ob primerjavi genetskih profilov smo pri vseh kosteh in zobeh zasledili ujemanje s še živečimi sorodniki. Tako smo s preiskavo autosomne jedrne DNK povezali hči UM s stegnenico skeleta 2 in identificirali žrtev UJ. S preiskavo autosomne jedrne DNK in mtDNK smo povezali nečakinjo CZ s stegnenico skeleta 3 in identificirali žrtev KJ. S preiskavo autosomne jedrne DNK, mtDNK in kromosoma Y pa smo povezali sina KJ in nečakinjo MZ s stegnenico skeleta 1 ter kočnikoma skeleta 2 in identificirali žrtev KF.*
- Zaključki** *Pri vseh treh žrtvah poboja pod Storžičem so izračunane verjetnosti sorodstva precej visoke (99,9999 % do 99,999999 %) in govorijo v prid pozitivni identifikaciji žrtev.*
- Ključne besede** *genetsko profiliranje; kosti; zobe; mikrosateliti; mtDNK*

**Abstract**

- Background** *This paper describes the application of molecular genetic methods for identifying the skeletal remains of the three victims of the post-war killings under the Storžič Mountain. We used femurs and teeth and compared their genetic profiles with the genetic material of living relatives.*
- Methods** *We cleaned the bones and teeth, removed surface contamination and ground the bones into powder. Prior to isolating the DNA using the Biorobot EZ1 (Qiagen), the powder was decalcified. The nuclear DNA of the samples were quantified using the real time PCR method. We acquired autosomal genetic profiles and Y-chromosome haplotypes, as well as mtDNA haplotypes, from all the bone and teeth samples and from reference persons. For the purposes of traceability in the event of contamination, we prepared an elimination data base including genetic profiles of the nuclear and mtDNA of all persons who have been in touch with the skeletal remains in any way.*
- Results** *We extracted up to 8.6 ng DNA/per g from the bone powder and, up to 55 ng DNA/per g from the teeth powder. When comparing genetic profiles, we matched all the bones and*

*teeth with the living relatives. By analysing the autosomal nuclear DNA, we were able to match the daughter UM with the femur of skeleton 2 to identify victim UJ. By analysing the autosomal nuclear DNA and the mtDNA, we were able to match the niece CZ with the femur of skeleton 3 to identify victim KJ. By analysing the autosomal nuclear DNA, the mtDNA and the Y-chromosome, we were able to match the son KJ and the niece MZ with the femur of the skeleton 1 and the molars of the skeleton 2 to identify victim KF.*

**Conclusions** *The research showed a high probability (from 99.9999 % to 99.999999 %) that all three victims of the killings under the Storžič Mountain are related to the living relatives, speaking in favour of the positive identification of the victims.*

**Key words** *genetic profiling; bones; teeth; microsatellites; mtDNA*

## Uvod

Molekularno genetske metode za identifikacijo biološkega materiala in preverjanje sorodstvenih povezav, ki temeljijo na pomnoževanju odsekov DNK v polimerazni verižni reakciji (angl. Polymerase Chain Reaction, PCR), se od začetka 90. let uporabljajo v sodnomojstvenih, kriminalističnih, paleoantropoloških in genealoških študijah. Pri jedrni DNK preiskujemo mikrosatelite ali kratke tandemske ponovitve, ki jih označujemo s kratico STR (angl. Short Tandem Repeat). Po pomnožitvi večjega števila lokusov STR v reakciji PCR in njihovi ločitvi s kapilarno elektroforezo, dobimo individualno specifičen alelni vzorec, ki ga imenujemo genetski profil.<sup>1-3</sup> Mikrosatelite preiskujemo na avtosomih in na spolnem kromosomu Y, ki nam omogoča sledenje paternalni liniji. Vsi moški sorodniki po očetovi liniji imajo namreč identičen STR – haplotip kromosoma Y. Iz starih kosti in zob zaradi močne degradacije vedno ni moč pridobiti dovolj kakovostne jedrne DNK, zato poteka v takih primerih identifikacija biološkega materiala s pomočjo sekvenčnih polimorfizmov mitohondrijske DNK (mtDNK), ki se za razliko od jedrne nahaja v celici v številnih kopijah in je zaradi krožne oblike manj izpostavljena razgradnji, kar ji omogoča daljšo ohranitev. Pri tipizaciji mtDNK preiskujemo najbolj variabilno nekodirajočo kontrolno regijo mtDNK (hipervariabilno regijo HVI in HVII mtDNK). Preiskava mtDNK nam je podobno kot preiskava kromosoma Y v veliko pomoč v primerih, ko so med sorodniki pogrešane osebe živeči le še nekaj

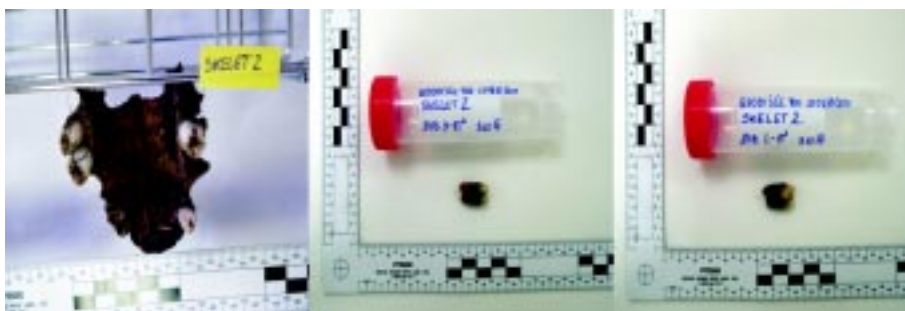
generacij oddaljeni sorodniki, saj se mtDNK deduje po materi in se ne rekombinira, kar nam omogoča sledenje maternalni liniji. Pri identifikaciji starih skeletnih ostankov preiskujemo, če je to le mogoče, tako polimorfizme jedrne DNK (avtosomsko DNK in kromosom Y) kot polimorfizme mtDNK.<sup>4</sup>

Z molekularnogenetskimi metodami so identificirali francoskega prestolonaslednika Ludvika XVII,<sup>5,6</sup> Martina Bormanna,<sup>7</sup> Josefa Mengeleja,<sup>8</sup> rusko carsko družino Romanov<sup>9,10</sup> in številne žrtve množičnih pobojev na ozemlju bivše Jugoslavije.<sup>11-13</sup> Uspešne so bile tudi preiskave mtDNK zelo starih skeletnih ostankov (tirolski ledeni človek – Ötzi,<sup>14</sup> neandertalec,<sup>15</sup> ...). V molekularnogenetskem laboratoriju Inštituta za sodno medicino smo pričeli z identifikacijo domobran-



Sl. 1. *Leva stegnenica skeleta 2 iz grobišča pod Storžičem.*

Figure 1. *Left femur of skeleton 2 from the graveyard under the Storžič Mountain.*



Sl. 2. *Levi in desni kočnik iz zgornje čeljustnice skeleta 2 iz grobišča pod Storžičem.*

Figure 2. *Left and right molar of the upper jaw of skeleton 2 from the graveyard under the Storžič Mountain.*

skih žrtev leta 2005. V prispevku predstavljamo identifikacijo žrtev manjšega grobišča pod Storžičem, iz katerega smo ob koncu leta 2007 prejeli tri okostja. Za identifikacijo smo odvzeli od vsakega skeleta majhen del leve stegenice in 2 zoba, če so bili zobje prisotni (pri skeletu 1 zob ni bilo, pri skeletu 3 je bil prisoten v zgornji čeljustnici le levi ličnik (LPM2), pri skeletu 2 pa smo odvzeli iz zgornje čeljustnice levi in desni kočnik (LM2 in DM2)). Kostni in zobe, ki smo jih uporabili za pridobitev DNK, smo pred preiskavo fotodokumentirali in označili s številkami. Na Sliki 1 in 2 je prikazan biološki material, ki smo ga uporabili za identifikacijo skeleta 2.

Pridobili smo seznam žrtev, ki naj bi bile ubite leta 1944, njihovi posmrtni ostanki pa naj bi ležali v grobišču pod Storžičem ter seznam njihovih še živečih sorodnikov:

1. žrtev UJ: sorodnica UM (hči)
2. žrtev KJ: sorodnica CZ (nečakinja)
3. žrtev KF: sorodnika KJ (sin) in MZ (nečakinja)
4. žrtev SP: sorodnica VL (hči)

Za primerjavo avtosomnih mikrosatelitov jedrne DNK smo kot referenčne osebe uporabili najbližje sorodnike žrtev, za primerjavo polimorfizmov mtDNK smo uporabili sorodnike po materini liniji, za primerjavo haplotipov kromosoma Y pa smo uporabili sorodnike po očetovi liniji. Na sterilnih vatiranih palčkah smo zbrali brise ustnih sluznic še živečih sorodnikov.

Pripravili smo eliminacijsko podatkovno zbirko, ki je vsebovala vse osebe, ki smo v katerikoli fazi zbiranja, shranjevanja in molekularno genetske preiskave, prišle v stik s skeletnimi ostanki. Zato smo pridobili brise ustnih sluznic vseh, ki so sodelovali pri izkopu, in vseh, ki smo na Inštitutu za sodno medicino sodelovali pri molekularno genetski identifikaciji. Eliminacijska podatkovna zbirka nam je omogočala sledljivost v primeru pojava kontaminacije.

Po priporočilih Alonsa,<sup>16</sup> Tullyja,<sup>17</sup> Bära,<sup>18</sup> Carraceda,<sup>19</sup> Kempa in Smitha,<sup>20</sup> Wilsona,<sup>21</sup> Kalmarja,<sup>22</sup> Davorena,<sup>12</sup> Tamariza<sup>23</sup> in Shawa<sup>24</sup> smo za zagotavljanje kakovosti in preprečevanje kontaminacije v genetskem laboratoriju upoštevali tele ukrepe:

1. da vzorca nismo kontaminirali z lastnim biološkim materialom, smo pri delu uporabljali dvojne čiste laboratorijske rokavice, svež laboratorijski plašč, kirurško masko za nos in usta ter kapo;
2. vse laboratorijske površine smo pred in po končanem delu očistili z 10-odstotnim detergentom Alconox (Alconox Inc.), sterilno bidestilirano vodo in 80-odstotnim etanolom;
3. vse orodje za čiščenje, brušenje in mletje kosti smo pred uporabo umili z 10-odstotnim detergentom Alconox, sterilno bidestilirano vodo in 80-odstotnim etanolom ter ga avtoklavirali in za 30 minut postavili pod UV-svetlobo;
4. vse reagentne, orodja in laboratorijsko plastiko smo pred uporabo postavili za 30 minut pod UV-svetlobo;
5. za vsak vzorec kosti ali zob smo uporabili čisto in sveže orodje;
6. vzorce DNK, pridobljene iz kosti ali zob, smo analizirali ločeno od referenčnih vzorcev (sorodni-

kov) vse od postopka izolacije DNK do končnih rezultatov tipizacije;

7. kontaminacijo s predhodnimi produkti reakcije PCR smo preprečili s fizično ločitvijo prostorov, kjer smo kosti in zobe čistili in mleli, od tistih, kjer smo osamili genomsko DNK, pripravljali PCR-reakcijske mešanice in analizirali amplifikacijske produkte;
8. vzporedno z DNK kosti in zob smo v vseh reakcijah PCR in sekvenčnih reakcijah pomnoževali negativno kontrolo (pomnožitev le-te nas opozarja na kontaminacijo reagentov s predhodnimi amplifikacijskimi produkti ali zunanjo DNK) in pozitivno kontrolo (z njo preverjamo učinkovitost amplifikacije);
9. negativne kontrole smo vključili tudi v sam postopek ekstrakcije genomske DNK, s čimer smo preverjali čistost izolacijskih reagentov;
10. uporabljali smo nastavke za pipete, ki vsebujejo filtre in so bili pred uporabo vsaj 30 minut izpostavljeni delovanju UV-svetlobe;
11. v prostoru, kjer smo ekstrahirali DNK iz kosti in zob, nismo obdelovali bioloških materialov, ki vsebujejo velike količine DNK (npr. kri, slina), pač pa je bil ta prostor namenjen izključno delu s stariimi kostmi in zobmi;
12. pri kosteh in zobeh smo ekstrakcije in amplifikacije ponovili dvakrat, s čimer smo preverili identičnost dobljenih rezultatov;
13. mtDNK smo vedno sekvencirali v obe smeri, s čimer smo zagotovili pravilnost določitve nukleotidnega zaporedja.

## Metode

Iz zgornjih čeljustnic smo s pinceto odstranili zobe, od stegenic pa smo z žago odrezali približno 5 cm dolge kose kompaktne kosti in jih vzdolžno prerezali. Zobe in kosti smo najprej mehansko in kemično očistili. Površinsko kontaminacijo smo odstranili s fizičnim odstranjevanjem površine ter spiranjem v 5-odstotnem detergentu Alconox, vodi in 80-odstotnem etanolu, zobe smo dodatno še 30 minut obsevali z UV-svetlobo.<sup>25</sup> Sledilo je mletje v homogenizatorju TissueLyser (Retsch) ob uporabi tekočega dušika. Genomsko DNK smo pridobili iz 0,5 g zobnega ali kostnega prahu po 24- do 48-urni dekalifikaciji v raztopini 0,5 M EDTA,<sup>26</sup> ob uporabi kompleta EZ1 DNK Investigator Kit in instoimentske raziskovalne kartice (Qiagen) v napravi Biorobot EZ1 (Qiagen). V isti napravi smo pridobili genomsko DNK iz sline sorodnikov in iz vzorcev, ki sestavljajo eliminacijsko podatkovno zbirko.<sup>27-29</sup>

Vse vzorce DNK smo pred pomnoževanjem v reakciji PCR kvantificirali z metodo kvantitativne reakcije PCR v realnem času. Za kvantifikacijo jedrne DNK smo uporabili komplet Quantifiler Human DNA Quantification kit (Applied Biosystems). Reakcijo smo izvedli v napravi ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) ob uporabi računalniškega programa SDS Software verzija 1.0 (Applied Biosystems).

Pri kosteh in zobeh domnevnih žrtev smo opravili tipizacijo jedrne avtosomske DNK s kompletom AmpF/STR Identifier™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems), s kompletom PowerPlex 16 System (Promega) in pri degradiranih vzorcih DNK še s kompletom MiniFiler (Applied Biosystems).<sup>30,31</sup> Opravili smo tudi tipizacijo mikrosatelitov na kromosomu Y s kompletom YFiler (Applied Biosystems).<sup>32-34</sup> Pri vseh naštetih kompletih je bila količina DNK, ki smo jo v reakciji PCR pomnoževali, večja od 100 pg.<sup>35</sup> Ob prisotnosti inhibitorjev smo v reakciji dodali BSA (končna koncentracija 100 ng/μl) ter dvakratno količino Taq-polimeraze. Ob zelo nizkih koncentracijah DNK smo število ciklov povečali za 2 ali 3 cikle. Fluorescentno označene produkte naštetih kompletov smo ločevali z avtomatskim genskim analizatorjem ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems), ob uporabi tekočega polimera POP 4 in notranjega velikostnega standarda GeneScan-500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems) ter notranjega velikostnega standarda ILS 600 (Promega). Genetske profile smo določili s pomočjo računalniških programov Data Collection v 3.0 in GeneMapper ID v 3.2 (Applied Biosystems). Vsem kostem in zobem smo določili nukleotidno zaporedje regij HVI in HVII mtDNK.<sup>36</sup> Reakciji PCR smo izvedli v cikličnem termostatu Biometra UNO-Thermoblock (Biometra). Amplifikacijske produkte smo prečistili z ultrafiltracijskimi enotami Centricon-100 (Millipore Corporation) in jih sekvencirali z metodo avtomatskega neposrednega fluorescentnega sekvenciranja ob uporabi kompleta BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, version 1.1 (Applied Biosystems). Fluorescentno označene produkte smo prečistili s kolonami MicroSpin™ G-50 (Amersham Biosciences) in jih ločevali z avtomatskim genskim analizatorjem ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems) ob uporabi tekočega polimera POP 4 in računalniških programov Data Collection v 3.0 in DNA Sequencing Analysis Software v 5.2 (Applied Biosystems).

Pri referenčnih osebah smo opravili tipizacijo jedrne avtosomske DNK za sorodnike po materini liniji smo določili nukleotidno zaporedje regij HVI in HVII mtDNK, za sorodnike po očetovi liniji pa smo opravili tipizacijo mikrosatelitov na kromosomu Y. Pri osebah za eliminacijsko podatkovno zbirko smo opravili tipizacijo jedrne avtosomske DNK, določili nukleotidno zaporedje regij HVI in HVII mtDNK, pri moških osebah pa smo opravili še tipizacijo mikrosatelitov na kromosomu Y.

Dobljene genetske profile kosti in zob ter sorodnikov smo med seboj primerjali in ugotavljali, ali imajo skupen izvor ali ne. Ob ujemanju genetskih profilov smo verjetnosti sorodstvenih povezav za avtosomske mikrosatelite izračunali s statističnim programom »DNA VIEW« v.28.48 (2007), avtorja C. H. Brennerja (Berkeley, USA). Verjetnosti sorodstvenih povezav za haplotipe kromosoma Y in za haplotipe mtDNK pa smo izračunali na osnovi frekvenc haplotipov v različnih podatkovnih zbirkah.<sup>37</sup> Za določitev frekvenc haplotipov kromosoma Y smo uporabili podatkovno zbirko YHRD - Y Chromosome Haplotype Reference Database,<sup>38</sup> ki vsebuje 11.213 haplotipov evrop-

skih populacij. Za določitev frekvenc haplotipov mtDNK pa smo uporabili podatkovno zbirko EMPOP - European Mitochondrial DNA Control Region Database,<sup>39</sup> ki vsebuje 4476 haplotipov evropskih populacij kavkaške rase.

Verjetnosti sorodstvenih povezav smo podali v obliki verjetnostnega razmerja LR. Poleg LR (ta se v primeru sorodstvenega odnosa oče-otrok imenuje indeks očetovstva in ga označimo s kratico PI) smo podali tudi vrednost za naknadno verjetnost sorodstva, ki jo označimo s kratico PP (ali W), pri kateri smo upoštevali 50-odstotno predhodno verjetnost sorodstva. Kadar smo opazili med kostmi (ali zobmi) in sorodniki ujemanje avtosomnih jedrnih genetskih profilov in haplotipov mtDNK, smo uporabili pri ocenitvi skupnega verjetnostnega razmerja (LRc) pravilo produkta. Enako smo naredili, kadar smo opazili ujemanje avtosomnih jedrnih genetskih profilov in haplotipov kromosoma Y.<sup>40</sup>

Dobljene genetske profile kosti in zob smo primerjali s profili oseb iz eliminacijske podatkovne zbirke, s čimer smo ugotavljali, ali je prišlo do kontaminiranja vzorcev kosti in zob s t. i. moderno DNK.

## Rezultati

Količina DNK v vzorcih kosti in zob je presegala vrednosti  $2,3 \times 10^{-2}$  ng/μl, le pri levem ličniku skeleta 3 jedrne DNK nismo zaznali in zaradi neznatne količine zobnega prahu tudi ni bilo možno ponoviti ekstrakcije (ličnik je tehtal le 0,26 g, saj je bila zobna krona povsem obrabljena). Tako smo pridobili iz stegnenic od 1,3 do 8,6 ng DNK/g kosti, iz zob pa od 11 do 55 ng DNK/g zoba. Od 3 levih stegnenic in 3 zob smo kompletne genetske profile avtosomske jedrne DNK, kromosoma Y in regij HVI in HVII mtDNK določili vsem vzorcem, razen levemu ličniku skeleta 3.

Žrtev poboja v grobišču pod Storžičem KF smo identificirali s primerjavo z dvema sorodnikoma. Za primerjavo jedrnih avtosomnih mikrosatelitskih polimorfizmov in haplotipov kromosoma Y nam je služil sin (KJ), za primerjavo haplotipov HVI-HVII mtDNK pa nečakinja po materini liniji (MZ). Leva stegenica skeleta 1 in dva kočnika skeleta 2 so imeli identičen haplotip mtDNK kot sorodnica MZ (HVI: identična CRS, HVII: 263(G), 309.1(C), 315.1(C)). Ta haplotip mtDNK smo v evropski kavkazijski podatkovni zbirki opazili pri 114 haplotipih. Vrednost za LR je 38,6 (to pomeni, da je 38,6-krat bolj verjetna hipoteza, da pripadajo leva stegenica skeleta 1 in dva kočnika skeleta 2 ter nečakinja MZ isti maternalni liniji kot hipoteza, da pripadajo različnim maternalnim linijam). Po primerjavi mikrosatelitskih lokusov avtosomske DNK smo ugotovili minimalno 50 % skupnih alelov med levo stegenico skeleta 1 in dvema kočnikoma skeleta 2 (vsi trije vzorci so imeli identičen avtosomski genetski profil) ter sinom KJ, kar ustreza sorodstvenemu odnosu oče : otrok. Za analizirane lokuse STR smo izračunali LR (PI), katerega vrednost je  $4,2 \times 10^4$  (to pomeni, da je 42.000-krat bolj verjetno, da leva stegenica skeleta 1 in dva kočnika skeleta 2 pripadajo osebi, ki je v sorodu s KJ, kot da pripa-

dajo neki naključno izbrani, s KJ nesrodni osebi iz slovenske populacije). Naknadna verjetnost starševstva-očetovstva (W) je 99,9976 %, pri čemer smo upoštevali 50 % predhodno verjetnost. KF smo identificirali s polimorfizmi jedrne avtosomne DNK (sin KJ) in mtDNK (nečakinja MZ), zato smo izračunali skupno verjetnostno razmerje LRC, katerega vrednost je  $1,6 \times 10^6$ . Naknadna verjetnost sorodstva (PP) je 99,99994 % (ob 50 % predhodni verjetnosti). Leva stegnenica skeleta 1 in oba kočnika skeleta 2 so imeli identičen haplotip kromosoma Y kot sin KJ. Tega haplotipa v evropski podatkovni zbirki nismo zasledili. Vrednost za LR je 5607, kar pomeni, da je 5607-krat bolj verjetna hipoteza, da pripadajo stegnenica in oba kočnika ter KJ isti paternalni liniji kot hipoteza, da pripadajo različnim paternalnim linijam. KF smo identificirali s polimorfizmi jedrne avtosomne DNK in s polimorfizmi kromosoma Y, zato smo izračunali skupno verjetnostno razmerje LRC, katerega vrednost je  $2,4 \times 10^8$ . Naknadna verjetnost sorodstva (PP) je 99,99999 % (ob 50 % predhodni verjetnosti). Žrtev poboja v grobišču pod Storžičem UJ smo identificirali s primerjavo s sorodnico, hčerko UM, pri čemer smo lahko primerjali lokuse STR avtosomne jedrne DNK, referenčne osebe za mtDNK pa nismo imeli na razpolago. Po primerjavi mikrosatelitskih lokusov smo ugotovili minimalno 50 % skupnih alelov med levo stegnenico skeleta 2 in hčerko UM, kar ustreza sorodstvenemu odnosu oče : otrok. Za analizirane lokuse STR smo izračunali LR (PI), katerega vrednost je  $3,2 \times 10^7$ . Naknadna verjetnost starševstva očetovstva (W) je 99,999997 % (ob 50 % predhodni verjetnosti). Žrtev poboja v grobišču pod Storžičem KJ smo identificirali s primerjavo s sorodnico, nečakinjo po materini liniji CZ, pri čemer smo lahko primerjali lokuse STR avtosomske jedrne DNK in haplotipe mtDNK. Leva stegnenica skeleta 3 je imela identičen haplotip mtDNK kot sorodnica CZ (HVI: 16263(C), HVII: 263(G), 309.1(C), 309.2(C), 315.1(C)). Tega haplotipa mtDNK v evropski kavkazijski podatkovni zbirki nismo zasledili, vrednost za LR je 2239. Za analizirane avtosomalne lokuse STR leve stegenice skeleta 3 in nečakinje CZ smo izračunali LR, katerega vrednost je 447. Naknadna verjetnost sorodstva (PP) je 99,8 % (ob 50-odstotni predhodni verjetnosti). KJ smo identificirali s polimorfizmi jedrne avtosomne DNK in mtDNK, zato smo izračunali skupno verjetnostno razmerje LRC, katerega vrednost je  $1 \times 10^6$ . Naknadna verjetnost sorodstva (PP) je 99,9999 %, (ob 50-odstotni predhodni verjetnosti).

## Razpravljanje in zaključki

Iz več kot 60 let starih kosti in zob, ki so bili zagrebeni v zemljo, smo uspeli pridobiti dovolj kakovostno jedrno DNK za uspešno tipizacijo mikrosatelitskih lokusov. Ob primerjavi genetskih profilov smo pri vseh treh kosteh in dveh zobeh zasledili ujemanje s še živečimi sorodniki. Ujemanje avtosomnih jedrnih profilov smo zasledili med levo stegnenico skeleta 1 in sinom (KJ) pogrešanega KF, med levo stegnenico skeleta 2 in hčerko (UM) pogrešanega UJ ter med levo stegnenico skeleta 3 in nečakinjo (CZ) pogreša-

nega KJ. Ujemanje haplotipov mtDNK je bilo prisotno pri levi stegnenici skeleta 1 in nečakinji (MZ) pogrešanega KF ter pri levi stegnenici skeleta 3 in nečakinji (CZ) pogrešanega KJ. Pri žrtvi UJ za primerjavo haplotipov mtDNK nismo imeli na razpolago primerne referenčne osebe. Ujemanje haplotipov kromosoma Y je bilo prisotno pri levi stegnenici skeleta 1 in sinu (KJ) pogrešanega KF. Pri žrtvah UJ in KJ za primerjavo haplotipov kromosoma Y nismo imeli na razpolago primernih referenčnih oseb. Enak genetski profil (avtosomski, mtDNK in kromosom Y), kot ga ima leva stegnenica skeleta 1, smo določili tudi pri levem in desnem kočniku skeleta 2, kar pomeni, da pripadata leva stegnenica skeleta 1 in lobanja skeleta 2 isti osebi in sicer KF. Pri vseh treh žrtvah poboja so izračunane verjetnosti sorodstva precej visoke in govoriyo v prid pozitivni identifikaciji. Tako se skupna verjetnostna razmerja LRC gibajo med  $10^6$  in  $2,4 \times 10^8$ , naknadne verjetnosti sorodstva pa med 99,9999 % in 99,999999 %. V Bosni in Hercegovini je International Commission on Missing Persons (ICMP) pozitivno identificiral preko 11600 oseb z verjetnostjo, ki je presegala 99,95 %.<sup>13</sup> Izključitev možnosti kontaminacije DNK in s tem avtentičnost vseh genetskih profilov kosti in zob iz grobišča pod Storžičem potrjujejo čiste izolacijske in amplifikacijske negativne kontrole, ponovljivost rezultatov dveh zaporednih preiskav in neujemanje genetskih profilov z osebami iz eliminacijske podatkovne zbirke.

## Literatura

1. Zupanič I, Balažic J, Komel R. Analysis of nine short tandem repeat (STR) loci in the Slovenian population. *Int J Legal Med* 1998; 111: 248–50.
2. Zupanič I. Uvedba preiskave DNA za prepoznavanje oseb in preverjanje sorodstvenih povezav v slovenski populaciji magistrsko delo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 1999.
3. 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: 178–80.
4. 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.
5. 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; 6: 383–95.
6. Jehaes E, Toprak K, Vanderheyden N, Pfeiffer H, Cassiman JJ, Brinkmann B, et al. 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: 135–41.
7. 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: 194–6.
8. 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.
9. Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Pierery R, Benson N, Tully G, et al. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet* 1994; 6: 130–6.
10. 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. *Nat Genet* 1996; 12: 417–20.

11. Primorac D, Andelinović S, Definis-Gojanović M, Drmić I, Rezić B, Baden MM, et al. Identification of war victims from mass graves in Croatia Bosnia and Herzegovina by the use of standard forensic methods and DNA typing. *J Forensic Sci* 1996; 41: 891-4.
12. Davoren J, Vanek D, Konjihodžić 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: 478-85.
13. Miloš A, Selmanović A, Smajlović L, Huel RLM, Katzmarzyk C, Rizvić A, et al. Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. *Croat Med J* 2007; 48: 486-93.
14. Handt O, Richards M, Trommsdorff M, Kilger C, Simanainen J, Georgiev O, et al. Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science* 1994; 265: 1775-8.
15. Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Pääbo S. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 1997; 90: 19-30.
16. Alonso A, Andelinović Š, Martin P. DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croat Med J* 2001; 42: 260-6.
17. 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.
18. 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: 193-6.
19. Carracedo A, Bär W, Lincoln P, Mary W. DNA commission of the International society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int* 2000; 110: 79-85.
20. Kemp BM, Smith DG. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Sci Int* 2005; 154: 53-61.
21. Wilson MR, DiZinno JA, Polanskey D, Replogle J, Budowle B. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic case-work analysis. *Int J Legal Med* 1995; 108: 68-74.
22. Kalmar T, Bachrati CZ, Marsik A, Rasko I. A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 67.
23. Tamariz J, Voyrnarowska K, Prinz M, Caragine T. The application of ultraviolet irradiation to exogenous sources of DNA in plasticware and water for the amplification of low copy number DNA. *J Forensic Sci* 2006; 51: 790-4.
24. Shaw K, Sesardić I, Bristol N, Ames C, Dagnall K, Ellis C, et al. Comparison of the effects of sterilisation techniques on subsequent DNA profiling. *Int J Legal Med* 2008; 122: 29-33.
25. Zupanič Pajnič I. Molekularno genetska identifikacija neznanih trupel iz skeletnih ostankov in zob. In: Luzar B, Poljak M, Glavač D, Balazic J, eds. *Molekularna diagnostika v medicini - 15. spominsko srečanje akademika Janeza Milčinskega in 36. memorialni sestanek profesorja Janeza Plečnika in 1. srečanje slovenskega društva za humano genetiko z mednarodno udeležbo*; 2005 Nov 30-Dec 2; Ljubljana, Slovenija. Ljubljana: Medicinska fakulteta; 2005.
26. Loreille OM, Diegoli TM, Irwin JA, Coble MD, Parsons TJ. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Sci Int Genet* 2007; 1: 191-5.
27. Nagy M, Otremba P, Krüger C, Bergner-Greiner S, Anders P, Henske B, et al. Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads technology in forensics. *Forensic Sci Int* 2005; 152: 13-22.
28. Montpetit SA, Fitch IT, O'Donnell PT. A simple automated instrument for DNA extraction in forensic casework. *J Forensic Sci* 2005; 50: 1-9.
29. Kishore R, Hardy WR, Anderson VJ, Sanchez NA, Buoncristiani MR. Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the biorobot EZ1 and biorobot M48. *J Forensic Sci* 2006; 51: 1055-61.
30. Vanderheyden N, Mai A, Gilissen A, Cassiman JJ, Decorte R. Identification and sequence analysis of discordant phenotypes between AmpFISTR SGM Plus and PowerPlex 16. *Int J Legal Med* 2007; 121: 297-301.
31. Hill CR, Kline MC, Mulero JJ, Lagace RE, Chang CW, Hennessy LK, et al. Concordance study between the AmpFISTR MiniFiler PCR Amplification Kit and conventional STR typing kits. *J Forensic Sci* 2007; 52: 870-3.
32. Gross AM, Berdos P, Ballantyne J. Y-STR concordance study between Y-Plex 5, Y-Plex 6, Y-Plex 12, Powerplex Y, Y-Filer, MPI, and MP11. *J Forensic Sci* 2006; 51: 1423-8.
33. Gross AM, Liberty AA, Ulland MM, Kuriger JK. Internal validation of the AmpFISTR Yfiler amplification kit for use in forensic casework. *J Forensic Sci* 2008; 53: 1-10.
34. Mayntz-Press K, Ballantyne J. Performance characteristics of commercial Y-STR multiplex systems. *J Forensic Sci* 2007; 52: 1025-34.
35. Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci Int* 2000; 112: 17-40.
36. Zupanič Pajnič I. Identifikacija oseb iz starih in slabo ohranjenih bioloških materialov s polimorfizmi mitohondrijske DNA (doktorsko delo). Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2007.
37. Gusmao L, Butler JM, Carracedo A, Gill P, Kayser M, Mayr WR, et al. 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.
38. Willuweit S, Roewer L. Y Chromosome Haplotype Reference Database. Dosegljivo na: [www.yhrd.org](http://www.yhrd.org)
39. Parson W. European Mitochondrial DNA Control Region Database. Dosegljivo na: [www.empop.org](http://www.empop.org)
40. Walsh B, Redd AJ, Hammer MF. Joint match probabilities for Y chromosomal and autosomal markers. *Forensic Sci Int* 2008; 174: 234-8.

---

Prispelo 2008-08-25, sprejeto 2008-10-13