

Irena Zupanič Pajnič¹

Forenzična genetika

Forensic Genetics

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: forenzična genetika, kratke tandemske ponovitve, mitohondrijska DNA, genetska tipizacija

Prispevek na pregleden način predstavlja forenzične genetske preiskave, ki se opravljajo v Sloveniji in tujini. V laboratoriju za molekularno genetiko Inštituta za sodno medicino preverjamo bližnje in daljne sorodstvene odnose ter opravljamo identifikacijo bioloških sledi v kriminalistiki in identifikacijo neprepoznanih in skeletiziranih človeških posmrtnih ostankov v rutinskih sodnomedicinskih preiskavah in tudi v grobiščih iz časa 2. svetovne vojne in povojnih pobojev ter arheoloških najdiščih. V medicinskih preiskavah opravljamo identifikacijo tkivnih vzorcev ob sumu na njihovo zamenjavo, spremljamo uspešnost transplantacije kostnega mozga in drugih krvotvornih matičnih celic ter določamo eno- oz. dvojajčne dvojčke. V prispevku opisujemo različne genetske označevalce, ki jih v forenzični genetiki zaradi njihove variabilnosti preiskujemo. Pri jedrni avtosomski DNA in kromosomu Y preiskujemo dolžinske polimorfizme področij kratkih tandemskih ponovitev, pri mitohondrijski DNA pa sekvenčne polimorfizme dveh variabilnih področij kontrolne regije mitohondrijske DNA. Opisanih je veliko genetskih preiskav, ki so bile opravljene z namenom identifikacije žrtev množičnih katastrof (tako naravnih kot tistih, ki so bile posledica človeškega nasilja), z namenom razkrivanja zgodovinskih dejstev in identifikacije znanih osebnosti človeške zgodovine.

ABSTRACT

KEY WORDS: forensic genetics, short tandem repeat, mitochondrial DNA, DNA typing

This article describes forensic genetics investigations performed in Slovenia and abroad. At the Molecular Genetic Laboratory of the Institute of Forensic Medicine, close and distinct kinship analyses are performed, biological stains are analyzed in casework, and human skeletal remains are identified from forensic investigations, World War II mass graves and archaeological sites. Identification of tissue samples is performed in clinical examinations whenever a suspicion of exchange appears. Furthermore, hematopoietic cell chimerism is monitored after bone marrow transplantations, and zygosity in twins is determined before transplantations. The paper describes variable genetic markers used in forensic genetics. Whenever nuclear autosomal and Y chromosome Short Tandem Repeat loci are used, length polymorphisms are traced. In the variable control region of the mitochondrial DNA, sequence polymorphisms are analyzed. In the paper, the most famous genetics investigations for the reconstruction of historical cases are presented, some mass disaster victim identifications are listed, and some identifications of notabilities of our past are described.

¹ Doc. dr. Irena Zupanič Pajnič, univ. dipl. biol., Laboratorij za molekularno genetiko, Inštitut za sodno medicino, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova ulica 2, 1000 Ljubljana; irena.zupanic@mf.uni-lj.si

UVOD

Na Inštitutu za sodno medicino Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani (ISM) že od leta 1996 opravljamo molekularnogenetske preiskave za identifikacijo oseb in bioloških sledi ter preverjamo sorodstvene povezave. Prvotne preiskave smo usmerili v raziskave polimorfizmov mikrosatelitskih področij avtosomske jedrne DNA, sledile so jim raziskave polimorfizmov mikrosatelitskih področij kromosoma Y in pred nekaj leti preiskave polimorfizmov mitohondrijske DNA (mDNA), saj tipizacija jedrne DNA pri starih in slabo ohranjenih bioloških materialih zaradi močne razgradnje ni bila vedno uspešna (1–5).

Za preverjanje sorodstvenih povezav (zlasti spornih očetovstev) in identifikacijo oseb iz razmeroma dobro ohranjenih bioloških materialov izoliramo genomsko DNA iz naslednjih bioloških vzorcev: kri in krvni madeži, slina in sledovi slin v kriminalističnih primerih (cigaretni ogorki, poštne znamke, zobne ščetke), tkiva, odvzeta pri obdukciji, sperma in vaginalni brisi, odvzeti po posilstvu, lasje z lasno korenino, prhljaj, citološki in histološki preparati, tkiva, vpeta v parafinske bloke, epitelijske celice na prstnem odtisu (kontaktne sledi) itd. Iz starih bioloških materialov (skeletni ostanki, zobje), slabo ohranjenih bioloških vzorcev (v eksplozijah, požarih ali prometnih nesrečah zoglenela in močno poškodovana trupla), iz starega fečesa ter mikrosledov v kriminalističnih primerih (izpadli lasje, ki so običajno brez korenin) pogosto ni mogoče izolirati dovolj kvalitetne jedrne DNA za uspešno tipizacijo mikrosatelitskih področij, pričakujemo pa lahko uspešno tipizacijo mDNA.

Ob metodi genetskega profiliranja jedrne DNA nam tipizacija mDNA v rutinskih preiskavah omogoča celosten pristop k molekularnogenetskimi identifikacijam biološkega materiala v sodni medicini in kriminalistiki. Tako smo v zadnjih letih uspešno identificirali žrtve povojnih množičnih grobišč (6–10). Genetsko smo obdelali štiri grobišča, za katera so bili na razpolago poimenski sezname žrtev, na osnovi katerih smo lahko zbrali primerjalne vzorce ustnih sluznic še živečih sorodnikov. Največje grobišče, ki smo ga molekularnogenetsko obdelali, je bilo grobišče Konfin I, iz

katerega so leta 2006 izkopali skeletne ostanke 88 žrtev, za katere smo uspeli pridobiti brise ustnih sluznic še živečih bližnjih in daljnih sorodnikov za 44 žrtev. Za preiskave smo uporabili stegenice, katerih genetske profile smo primerjali s še živečimi sorodniki. Ob primerjavi genetskih profilov kosti s še živečimi sorodniki smo pri 32 kosteh zasledili ujemanje z referenčnimi osebami (sestrami, brati, hčerami, sinovi, bratranci in nečaki) in pri vseh izračunali verjetnost sorodstva, ki je presegala vrednost 99,9 %, kar po mednarodnih priporočilih zadostuje za pozitivno identifikacijo. Dokazali smo, da je ob preiskavi večjega števila genetskih označevalcev (avtosomski mikrosateliti, mikrosateliti kromosoma Y in kontrolna regija mDNA) in vključitvi bližnjih in daljnih sorodnikov žrtev v analizo mogoče pozitivno identificirati žrtve 2. svetovne vojne, za katere je zaradi časovne oddaljenosti težko pridobiti še živeče bližnje sorodnike. Molekularnogenetska identifikacija žrtev grobišča Konfin I je objavljena v najuglednejši svetovni forenzični reviji *International Journal of Legal Medicine* (10). Trenutno poteka v Laboratoriju za molekularno genetiko ISM molekularnogenetska identifikacija skeletnih ostankov domnevnih članov rodbine Auersperg iz 17. stoletja. Te kosti in zobe obdelujemo po postopkih, primernih za starodavne skeletne ostanke, pri katerih je zlasti pomembna popolna demineralizacija (11).

Na ISM opravljamo naslednje forenzično-genetske preiskave (6–10, 12–17):

- preverjanje sorodstvenih odnosov (bližnji sorodstveni odnosi, kot so sporna očetovstva, in daljne sorodstvene povezave),
- identifikacija bioloških sledi v kriminalističnih primerih (umori, posilstva, ropi, rekonstrukcije prometnih nesreč in iskanje sledi voznika itd.),
- identifikacija skeletiziranih posmrtnih ostankov ter razpadlih in zoglenelih trupel (neznana trupla in masovne katastrofe),
- identifikacija tkivnih vzorcev,
- spremljanje uspešnosti transplantacije kostnega mozga in drugih krvotvornih matičnih celic,
- določanje, ali sta dvojčka eno- ali dvojajčna,

- preverjanje identitete bioloških vzorcev, odvzetih za alkoholimetrične ali toksikološke preiskave,
- identifikacija žrtev 2. svetovne vojne in povojnih pobojev in
- identifikacija skeletnih ostankov iz arheoloških najdišč.

Molekularnogenetske metode za identifikacijo biološkega materiala in preverjanje sorodstvenih povezav se od začetka devetdesetih let uporabljajo v sodnomoedicinskih, kriminalističnih, paleoantropoloških in genetskih študijah, pa tudi v študijah muzejskih živalskih in rastlinskih materialov (18, 19). Z metodo genetskega profiliranja določamo alele vzorcev oz. genetske profile jedrne DNA. Ta metoda nam prvič v zgodovini omogoča pozitivno identifikacijo in ne le izključitve. Vse predhodne metode so namreč uporabljale serološke in biokemične označevalce, ki so imeli prenizko variabilnost, da bi lahko natančno določili identiteto vzorca (20). Zelo uspešno uporabo polimorfizmov DNA je omogočilo odkritje verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR), pri kateri polimorfne odseke DNA pomnožimo v milijon ali več kopijah. Tako je danes mogoča uspešna identifikacija las, slin iz cigaretnega ogorka, slin iz poštne znamke, prhljaja, epitelijskih celic na prstnem odtisu (kontaktna sledi) in paleoantropološkega biološkega materiala (21).

Uspešnost genetskih identifikacijskih metod je odvisna od količine in kvalitete izolirane DNA in torej od ohranjenosti biološkega materiala, ki ga želimo preučevati. Pri svežih tkivih in sorazmerno dobro ohranjenih bioloških vzorcih z metodo genetskega profiliranja analiziramo dolžinske polimorfizme jedrne DNA (avtosomske kromosome in kromosom Y). Pri starih in problematičnih vzorcih pa se lahko zgodi, da zaradi močne razgradnje jedrne DNA ni mogoče pridobiti zadostnih količinah. V takih primerih uporabimo sekvenčne polimorfizme mDNA. Problematisne biološke vzorce predstavljajo stari skeletni ostanki in zobje, slabo ohranjeni ali močno poškodovani človeški posmrtni ostanki (v letalskih, železniških in prometnih nesrečah, eksplozijah in požarih zoglenela in močno poškodovana trupla, žrtve naravnih nesreč, terorističnih napadov ali vojn), stari

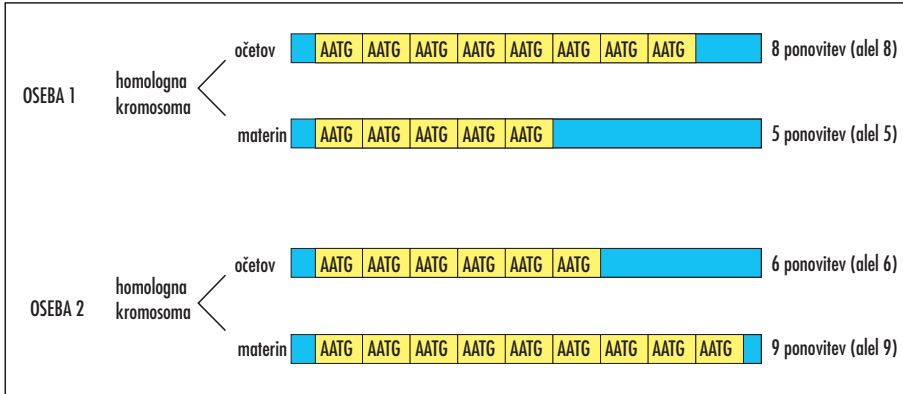
nohti, feces in urin ter mikrosledovi v kriminalističnih primerih (zlasti izpadli telogeni lasje, ki jih kriminalisti pogosto najdejo na kraju kaznivega dejanja) (5).

PREISKAVE JEDRNE DNA

Na jedrni DNA opravljamo dve vrsti preiskav. Prva je preiskava avtosomskih kromosomov, druga pa preiskava spolnih kromosomov, zlasti moškega spolnega kromosoma Y. Oba tipa preiskav uporabljamo za reševanje različnih sodnomoedicinskih primerov. Vzrok za to so razlike v načinu dedovanja avtosomov in kromosoma Y ter velike razlike v diskriminacijskem potencialu (moči razlikovanja) obeh tipov preiskav (22).

Avtosomska DNA

Avtosomska DNA je najbolj polimorfna, zato jo najpogosteje preiskujemo tako pri preverjanju bližnjih sorodstvenih povezav kot pri identifikacijskih testih. Avtosomski genetski profil lahko določimo vsem biološkim vzorcem, ki vsebujejo celice s celičnim jedrom, v katerih se nahaja DNA. Analiziramo mikrosatelite ali kratke tandemske ponovitve (angl. *short tandem repeat*, STR). Področja STR predstavljajo individualno najbolj specifične odseke človeškega genoma. Njihova variabilnost znotraj populacije je tako visoka, da lahko z uporabo večjega števila področij STR med seboj razlikujemo kateri koli osebi razen enojajčnih dvojčkov, katerih dednina je identična. Pripadajo nekodirajoči DNA in ne kodirajo beljakovin ter so raztreseni po vsem genomu. So nevtralni, kar pomeni, da ne nosijo nobene informacije o fenotipskih lastnostih posameznika in nam omogočajo le ugotavljanje identitete. Področja STR imajo obliko kratkih, tandemsko ponovljenih nukleotidnih zaporedij, osnovnih motivov, ki se ponavljajo v številnih identičnih ali sorodnih kopijah. Dolžinski polimorfizem področij STR torej temelji na variacijah v številu ponovitev osnovnega motiva. Ljudje se med seboj razlikujemo v številu ponovitev osnovnega motiva preiskovanih področij STR. Na vsakem avtosomskem področju STR imamo dva alela. Enega smo podedovali po materi in drugega po očetu. Alele označujemo s številkami, ki predstavljajo število ponovitev osnovnega motiva. Forenzič-



Slika 1. Shematski prikaz dolžinskega polimorfizma lokusa kratkih tandemskih ponovitev (STR).

na področja STR imajo v glavnem osnovni motiv dolžine 4 nukleotidov, njihova skupna dolžina pa ne presega 400 nukleotidov (22).

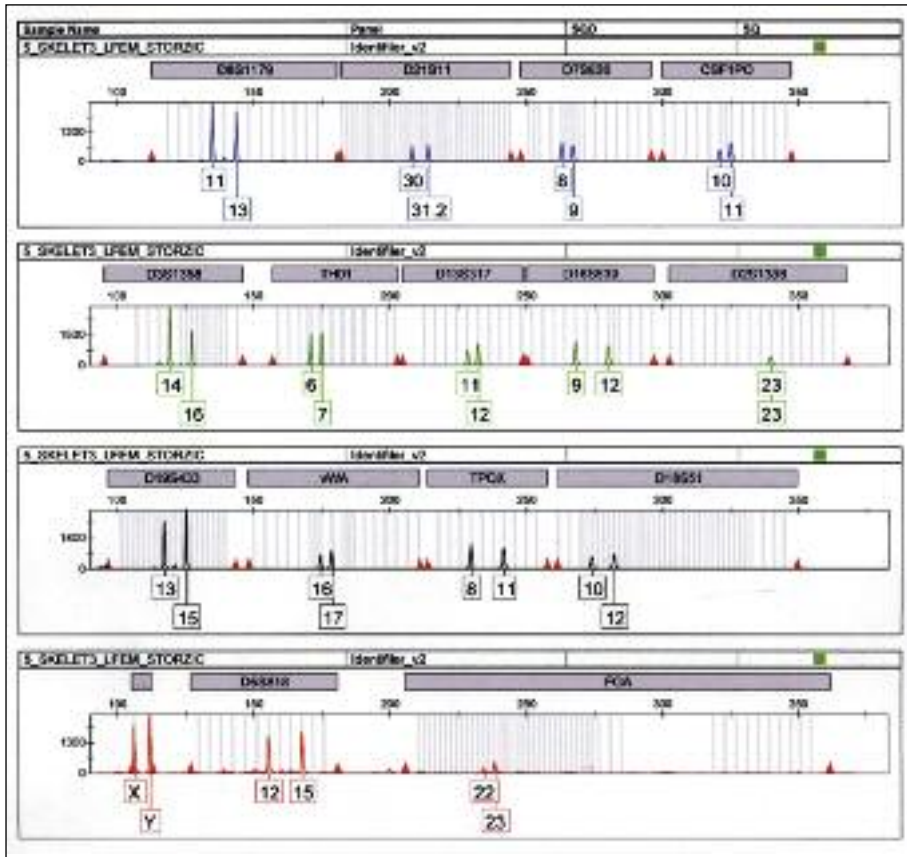
Na sliki 1 je shematsko prikazan dolžinski polimorfizem enega od področij oz. lokusov STR. Osnovni motivi so obarvani rumeno, njihovo nukleotidno zaporedje je AATG, mejna področja lokusa pa so obarvana modro. Obe prikazani osebi imata zaradi različnega števila ponovitev osnovnega motiva na lokusu različno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

Rodovniške analize so pokazale, da se področja STR razporejajo neodvisno s staršev na potomce, kažejo kodominantno naravo alelov in se dedujejo strogo po Mendlovih zakonih dedovanja, po katerih otrok vedno podeduje en alel od matere in enega od očeta. Na tej osnovi temeljijo preverjanja spor nih očetovstev in druge preiskave, pri katerih ugotavljamo bližnje sorodstvene povezave med posamezniki. Identifikacijski testi, pri katerih iščemo popolno identičnost genetskih profilov analiziranih vzorcev in jih najpogosteje uporabljamo v kriminalističnih primerih, pa temeljijo na predpostavki, da imajo vsa tkiva posameznika enak genotip. Po pomnožitvi večjega števila področij STR v verižni reakciji s polimerazo in ločitvi produktov reakcije s kapilarno elektroforezo, dobimo individualno specifičen alelni vzorec ali genetski profil (imenujemo ga tudi profil DNA ali pro-

fil STR) preiskovanih mikrosatelitov posameznika ali biološke sledi.

Genetski profil grafično prikažemo v obliki elektroferograma, na katerem vsak vrh ustreza enemu alelu področja STR. Os x nam podaja dolžino fragmentov DNA (aleli so označeni s številom ponovitev osnovnih motivov), os y pa intenziteto fluorescentnega signala v relativnih enotah fluorescence (RFU). Elektroferogram v obliki, kot je prikazan na sliki 2, oddamo kot končni rezultat genetske preiskave. Na sliki 2 je prikazan produkt reakcije AmpF/STR Identifiler (*Applied Biosystems*), v kateri smo pomnožili 15 področij STR avtosomske jedrne DNA, ki smo jo pridobili iz leve stegenice skeleta 3, najdenega v povojnem grobišču pod Storžičem.

Profile lahko med seboj primerjamo in ugotavljamo, ali imajo skupen izvor ali ne. Kadar se dva profila med seboj ne ujemata, biološka vzorca nimata skupnega izvora. Ob popolnem ujetanju genetskih profilov pa potrdimo skupen izvor vzorcev. S preiskavo 15 avtosomskih področij STR dosežemo pri identifikacijskih testih verjetnost ujemanja približno od 10^{-15} do 10^{-19} (to je verjetnost, da bosta imeli dve naključno izbrani in sorodstveno nepovezani osebi identičen genetski profil na preiskovanih 15 področjih STR). Pri preverjanju spornih očetovstev pa dosežemo verjetnost očetovstva, ki v glavnem presega vrednost 99,999%. Po mednarodnih priporočilih mora za potrditev sorodstvenega odnosa ta verjetnost presegati vrednost 99,9%.



Slika 2. Elektroferogram genetskega profila, ki smo ga pridobili iz leve stegenice skeleta 3, najdenega v povojnem grobišču pod Staričem. Za pomnoževanje področij STR smo uporabili komplet AmpFISTR Identifier™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems), s katerim smo v posamezni reakciji sočasno pomnožili 15 področij STR in odsek amelogeninskega gena, ki omogoča določitev spola. Z modro barvo so označena 4 področja STR (od najkrajšega do najdaljšega si sledijo po velikosti v naslednjem vrstnem redu: D8S1179, D21S11, D7S820 in CSF1PO), z zeleno 5 področij STR (D3S1358, TH01, D13S317, D16S539 in D2S1338), s črno 4 področja STR (D19S433, vWA, TPOX in D18S51) in z rdečo 2 področja STR (D5S818 in FGA) ter odsek amelogeninskega gena, homolognega kromosomoma X in Y, ki omogoča določitev spola. STR – kratke tandemske ponovitve.

Preverjanje sorodstvenih povezav

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

vanja bližnjih sorodstvenih povezav uporabni tudi za reševanje imigracijskih primerov, s katerimi se je v preteklosti v Evropi najpogosteje srečevala Velika Britanija (23). Po britanskem zakonu imajo imigranti s stalnim bivališčem pravico zahtevati stalno bivališče tudi za najbližje sorodnike, pri čemer morajo dokazati prvostopenjsko sorodstveno povezavo. Poleg tega te teste uporabljamo za preverjanje družinskih sorodstvenih odnosov v grobiščih (primer je identifikacija ruske vladarske družine Romanov) in za identifikacijo posmrtnih ostankov z reverznimi testi star-

ševstva. Pri teh testih preverjamo, ali imajo posmrtni ostanki domnevnega sina ali hčere genetski profil, ki ustreza genetskemu profilu otroka še živečih analiziranih staršev. Uporabljamo jih pri masovnih katastrofah, kot so letalske nesreče in potresi, ter pri identifikacijah posmrtnih ostankov v množičnih grobiščih. Pri vseh masovnih katastrofah, pri katerih začnejo z identificiranjem pogrešanih oseb neposredno po nesreči (letalske nesreče, teroristični napad na Svetovni trgovinski center v New Yorku leta 2001 itd.), so za genetske preiskave najprimernejši referenčni oz. primerjalni vzorci osebni predmeti (zobne ščetke, glavniki, brivniki), ki jih najdemo v domovih pogrešanih oseb. Tovrstni vzorci nam namreč omogočajo neposredno primerjavo genetskih profilov v smislu iskanja identičnosti, kar je zaradi majhnega števila referenčnih vzorcev z ekonomskega vidika najracionalnejši pristop.

Pri zastarelih masovnih katastrofah (množična grobišča iz časa 2. svetovne vojne in povojnih pobojev v Sloveniji, množična grobišča v BiH itd.) pa osebnih predmetov pogrešanih po vrsti let ni več mogoče zbrati, zato nam kot referenčni vzorci služijo njihovi še živeči sorodniki. Identiteto pogrešanega oz. žrtve najlažje določimo, če imamo na voljo primerjalne vzorce bližnjih sorodnikov. Če teh ni, moramo za uspešno genetsko identifikacijo (pri kateri poleg avtosomskih področij STR preiskujemo še področja STR, vezana na kromosom Y in mDNA) zbrati čim večje število sorodnikov pogrešane osebe (za primerjavo kromosoma Y sorodnike po očetovi liniji, za primerjavo mDNA pa sorodnike po materini liniji), kar močno poveča stroške tovrstnih preiskav.

Velikokrat se uporablja jedrne polimorfizme za identifikacijo žrtev množičnih nesreč, kot so naravne katastrofe (potresi, poplave, požari, cunamiji), letalske in železniške nesreče ter teroristični napadi (24–30). Tako so Olaisen in njegovi sodelavci identificirali 139 od skupno 141 ruskih in ukrajinskih žrtev letalske nesreče, ki se je zgodila avgusta 1996 v Spitsbergnu (25). Uspešnost identifikacije s pomočjo analize DNA je v celoti odvisna od razpoložljivosti referenčnih vzorcev. Le dve žrtvi nista imeli bližnjih sorodnikov, zato jih s tipizacijo DNA niso mogli identificirati, pri

drugih žrtvah pa je bila identifikacija uspešna. Genetske profile, ki so jih dobili iz močno poškodovanih delov teles, so primerjali z genetskimi profili bližnjih sorodnikov. Najprimernejši referenčni vzorci so matere, očetje ali otroci žrtev, saj imajo na posameznem področju STR vsaj en skupni alel. Če so bile na razpolago le sestre ali bratje, so kot referenčne vzorce uporabili več bratov in/ali sester. Pri letalski nesreči v Spitsbergnu je bila tipizacija DNA primarna identifikacijska metoda. Zaradi izredno visokega odstotka uspešnih identifikacij (98,6%), hitrih analiz (identifikacijo žrtev so zaključili 20 dni po nesreči) in razmeroma nizke cene (110.000 USD oz. 3–5 % cene celotne operacije) se je izkazala kot izredno primerna identifikacijska metoda pri množičnih katastrofah (25). S preiskavo jedrne DNA poteka identifikacija žrtev množičnih pobojev na ozemlju bivše Jugoslavije (31, 32). Prav tako je s tipizacijo jedrne DNA Jeffreys s sodelavci identificiral nacističnega zdravnika Josefa Mengeleja (referenčni osebi sta bila sin in žena) (33).

Identifikacija celične populacije po presaditvi kostnega mozga in drugih krvotvornih matičnih celic ter določanje eno- oziroma dvoajčnih dvojčkov

Določanje izvora celične populacije po transplantaciji kostnega mozga je pomembno za nadzorovanje uspešnosti presaditve. Bolnika in darovalca presadka tipiziramo pred transplantacijo (določimo genetske profile na področjih STR), po transplantaciji pa pri bolniku v določenih časovnih intervalih preverjamo razmerje med bolnikovimi in darovalčevimi populacijami levkocitov. Uspešnost transplantacije potrdimo, ko se v bolnikovi krvi pojavi genetski profil darovalca. Z ugotavljanjem razmerja med genetskim profilom bolnika in darovalca lahko določimo stopnjo vcepitve presadka. Tovrstna informacija je zelo uporabna v zgodnji potransplantacijski fazi, saj omogoča odločitev za dodatno zdravljenje, ki prepreči neuspešno transplantacijo oz. ponoven pojav bolezni (34).

Določanje eno- ali dvoajčnih dvojčkov je pomembno ob potrebi po transplantaciji določenega tkiva ali organa. Če se dvojčka popolnoma ujemata v genetskih profilih, smo tipizirali enojajčna dvojčka.

Identifikacijski testi

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

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

Verjetnost izračunamo empirično in temelji na populacijskih podatkih. Za oceno moči genetskega dokaza potrebujemo za vsako področje STR opravljeno populacijsko študijo na slovenski populaciji z izračunanimi alelnimi frekvencami ter preverjeno neodvisnostjo genetskih podatkov znotraj posameznega področja in med področji STR (1, 2, 12). Če je populacijski vzorec velik, bo empirično določena verjetnost oz. frekvenca določene genetskega profila zelo dober približek resnični frekvenci. Pri izračunavanju frekvenca genetskega profila v populaciji uporabljamo »pravilo produkta«, ki ga podaja verjetnost kombiniranih dogodkov. Če so dogodki neodvisni, je skupna verjetnost, da se vsi zgodijo skupaj, produkt verjetnosti posameznih dogodkov. V forenziki predstavljajo dogodke posamezna področja STR. Ker morajo biti dogodki naključni in med seboj neodvisni, se področja STR ne smejo dedovati vezano (ležati morajo na različnih kromosomih ali čim dlje narazen na istem kromosomu). Frekvenco genotipa na enem področju STR ocenimo kot produkt alelnih frekvenc (za homozigota je ta frekvenca p^2 , za heterozigota pa $2pq$). Skupno frekvenco genetskega profila na vseh analiziranih področjih STR pa ocenimo kot produkt frekvenc genotipov posameznih področij. Frekvenca genetskega profila predstavlja verjetnost, s katero pride v populaciji do naključnega ujemanja dveh profilov sorodstveno nepovezanih oseb. Frekvenca je majhna, če je v profil vključenih veliko področij STR (pri tipizaciji 15 področij STR približno od 10^{-15} do 10^{-19}). Ujemanje dveh genetskih profilov statistično ovrednotimo z verjetnostnim razmerjem, ki ga označimo s kratico LR (angl. *likelihood ratio*) in je obratno sorazmerno frekvenci genetskega profila: $LR = 1/\text{frekvenca genetskega profila (2)}$. Pri izračunu LR primerjamo verjetnost dogodka, da biološka sled pripada osumljenecu (števec), in verjetnost dogodka, da biološka sled pripada naključno izbrani osebi iz slovenske populacije (imenovalec). Verjetnost v števcu je 1, verjetnost v imenovalcu pa je enaka frekvenci genetskega profila. Verjetnostno razmerje nam pove, kolikokrat bolj verjetno je, da biološka sled pripada osumljenecu, kot da pripada naključno izbrani osebi iz slovenske populacije. Na našem inštitutu ga računamo s pomočjo statističnega programa

DNA VIEW v.29.48 (2011) avtorja C. H. Brennerja (38).

Avtosomska področja STR so zaradi rekombinacije v molekularnogenetskih genealoških študijah pri primerjavi z daljnimi sorodniki manj uporabna. Za preučevanje rodovnikov z genetskimi metodami so uporabna področja STR, vezana na kromosom Y, ki nam omogočajo sledenje očetovi liniji, in preiskave mtDNA, s katero lahko sledimo materini liniji. Ker biološko materinstvo v nasprotju z biološkim očetovstvom po navadi ni sporno, so vsekakor rezultati, ki jih dobimo s preiskavo mtDNA, zanesljivejši od rezultatov preučevanja kromosoma Y. Verjetnost, da je nekje v predniški očetovi liniji prišlo do nebiološkega očetovstva zaradi nezvestobe, posilstev ali posvojitve, je v ZDA približno 5%. Ni veliko, vendar bi lahko po 10 generacijah verjetnost, da bi v krvni liniji prišlo do dogodka, ki ga genetiki imenujemo nebiološko očetovstvo, preseгла 50%.

Kromosom Y

V sodnomoedicinskih in kriminalističnih preiskavah se je širša uporaba področij STR, veza njih na kromosom Y (Y-STR), začela leta 1996. Kromosom Y je haploiden in se deduje po očetu, kar nam omogoča sledenje očetovi liniji. To pomeni, da lahko v preiskave vključimo le moške, saj ga ženske nimajo. Kromosom Y nima kromosomskega partnerja, s katerim bi se pri meiozi rekombiniral (izjema sta dve majhni psevdosomski področji, ki se rekombinirata s kromosomom X), zato se z očeta na sina prenaša v identični obliki. Edine spremembe na kromosomu Y povzročajo redke mutacije. Ko pride do mutacije, se zaradi odsotnosti rekombinacije le-ta ohrani in prenese na naslednjo generacijo. Zato vsebuje vsak kromosom Y zapis vseh mutacijskih dogodkov, do katerih je prišlo na Y kromosomih prednikov mnogo let nazaj. Kadar preučujemo rodovnike znotraj 8–9 generacij, je mutacijska stopnja kromosoma Y zelo nizka ($1,9-5,4 \times 10^{-9}$ na nukleotid/leto) (39).

Kromosom Y nam omogoča reševanje t. i. pomanjkljivih spornih očetovstev, kjer biološki material domnevnega očeta ni na razpolago za analizo, namesto njega pa lahko testiramo njegove moške sorodnike, katerih kromosom Y je identičen (očeta, dedka, brate, stri-

ce). Žal pa lahko na ta način preverjamo sporna očetovstva le, ko je otrok moškega spola. Če se haplotipi kromosoma Y testiranih očetovih sorodnikov po očetovi strani razlikujejo od otrokovega haplotipa, govorimo o izključitvi. Pri tem je dobro preveriti, ali ni prišlo do izključitve očetovstva že v eni od prejšnjih generacij. Kromosom Y nam služi kot zelo koristen dodaten sistem pri identifikaciji žrtev množičnih pobojev ob koncu 2. svetovne vojne v Sloveniji, saj lahko v preiskavo vključimo tudi daljne sorodnike po očetovi liniji, hkrati pa lahko s pomočjo kromosoma Y pri bližnjih sorodnikih, npr. bratih, povečamo izračunano statistično verjetnost sorodstva med žrtvijo in še živečim sorodnikom (40).

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

Spolna kromosoma X in Y nam omogočata določanje spola forenzičnega vzorca tako v kriminalističnih kot v genealoških in sodnomedicinskih primerih, pri katerih imamo opravka s skeletiziranimi posmrtnimi ostanki ali neprepoznavnimi trupli. Test za določanje spola temelji na pomnoževanju kratkega odseka introna 1 amelogeninskega gena na kromosomih X in Y in ga je opisal Sullivan s sodelavci (42). Amelogenin je protein, ki sodeluje pri razvoju skleninskega matriksa zobne pulpe pri sesalcih. V nasprotju s področji STR amelogeninski gen ne predstavlja ponavljajočega se nukleotidnega zaporedja (43). Med homolognimi geni kromosoma X in Y je amelogeninski gen najprimernejši za določanje spola. Po PCR, pri kateri uporabimo en par začetnih oligonukleotidov, dobimo za kromosoma X in Y specifične produkte, ki se med seboj razlikujejo po dolžini. Na pomnoženem intronskem odseku je namreč med kromosomoma X in Y prisotna dolžinska razlika. Na kromosomu X je v evoluciji prišlo do delecije šestih baznih parov, zato dobimo krajši amplifikacijski produkt kot na kromosomu Y. Pri pomnoževanju ženske DNA (XX) dobimo produkta istih dolžin, pri pomnoževanju moške DNA (XY) pa produkta dveh različnih dolžin, ki se med seboj razlikujeta za šest baznih parov. Ker so produkti pomnoževanja odseka amelogeninskega gena zelo kratki, lahko določamo spol tudi za močno razgrajene vzorce (44). Odsek amelogeninskega gena pomnožujemo v hkratni reakciji PCR skupaj s področji STR, kar nam omogoča poleg ugotavljanja identitete tudi določanje spola. Kombinacija obeh informacij je zelo uporabna pri analizi kriminalističnih vzorcev (42).

Ker se kromosom Y in priimki v zahodni civilizaciji dedujejo po moški liniji, lahko sledimo prednikom po pisnih virih (priimki in kraj izvora) in te izsledke primerjamo s preiskavami kromosoma Y še živečih domnevnih potomcev po paternalni liniji. Pri preučevanju paternalnih rodovnikov preko priimkov ljudi predvsem zanima, ali je nek moški, ki so ga odkrili v pisnih virih in je prišel npr. iz Evrope v ZDA sredi 18. stoletja, njihov prednik. Kot primerjalni vzorci so uporabni moški, ki živijo v bližini kraja, od koder je priseljenec pripotoval v Ameriko in imajo enak priimek. Genetska analiza vključuje približno

17 področij Y-STR. Če se moška, ki iščeta skupnega prednika, razlikujeta na treh ali več področjih STR, nista sorodna (s tem upoštevamo možnost mutacijskega dogodka), v nasprotnem primeru pa imata skupnega prednika in sta daljna sorodnika.

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

PREISKAVE MITOHONDRIJSKE DNA

Kadar analiza jedrne DNA (tako avtosomske kot DNA, vezane na kromosom Y) zaradi premajhne količine genetskega materiala ali njegove razgrajenosti ni uspešna, se poslužujemo polimorfizmov mDNA, ki jih od leta 1992 uporabljamo v forenzičnih preiskavah. Posamezna človeška celica vsebuje številne kopije mDNA, kar daje v primerjavi z le dvema kopijama avtosomskih kromosomov veliko večjo možnost izolacije mDNA iz slabo ohranjenih bioloških vzorcev, kot so telogeni lasje, stare kosti, zobje, feces, urin in nohti (46). V metabolno aktivnih celicah najdemo 1.000–10.000 molekul mDNA. Krožna oblika in mitohondrijska ovojnica ščitita mDNA pred razgradnjo z eksonukleaznimi encimi, zato je mDNA manj podvržena razgradnji kot jedrna DNA (47). To še dodatno poveča možnost uspešne analize slabo ohranjenih vzorcev z mDNA. Mitohondriji se nahajajo v citoplazmi, zato se mDNA deduje neodvisno od jedrnega genoma. Za gene, ki se nahajajo zunaj jedra, je značilno citoplazmatsko dedovanje, katerega skrajni primer je dedovanje po enem staršu, večino

ma po materi. Mitohondrijska DNA se pri človeku deduje po materi in se v nasprotju s kromosomom Y prenese na vse njene potomce ne glede na spol, kar omogoča sledenje materini liniji. Zaradi maternalnega dedovanja obravnavamo nukleotidno zaporedje mDNA kot enolokusno ali haplotipsko (48). Zaradi odsotnosti rekombinacije in dedovanja po materi imajo osebe z enakimi zaporedji nukleotidov mDNA skupnega ženskega prednika. To je osnova za identifikacijo bioloških vzorcev s pomočjo analize mDNA. V nasprotju s kromosomom Y ima mDNA nekoliko višjo mutacijsko stopnjo ($3,5 \times 10^{-8}$ / nukleotid / leto) (49).

Mitohondrijska DNA predstavlja pri človeku 0,3 % genomske DNA. Je majhna, dvovertična, kovalentno zaprta krožna molekula, ki jo sestavljata zunanja težka veriga (veriga H) in notranja lahka veriga (veriga L). Dolga je 16.569 baznih parov (bp) in ima v celoti določeno nukleotidno zaporedje (50). Z vidika forenzičnih molekularnogenetskih preiskav je zaradi izredne polimorfnosti zanimiva zlasti nekodirajoča kontrolna regija mDNA. V kodirajočih področjih pa so zanimive točkovne mutacije, ki jih imenujemo enonukleotidni polimorfizmi (angl. *single nucleotide polymorphism*, SNP). Ti nam omogočajo povečanje diskriminacijske in izključitvene moči molekularnogenetskih identifikacij s tipizacijo mDNA (51). Variabilno kontrolno regijo mDNA imenujemo tudi zanka D. Znotraj te zanke sta najbolj variabilni hipervariabilni področji 1 in 2 (HVI in HVII), od katerih je vsako dolgo približno 400 bp. HVI ima večje število sekvenčno variabilnih mest in nižjo frekvenco posameznih polimorfizmov, HVII pa manjše število sekvenčnih polimorfizmov, ki imajo višjo frekvenco (52). Identifikacije s pomočjo mDNA temeljijo na sekvenčnem polimorfizmu teh dveh področij. Belci se med seboj razlikujejo na obeh področjih povprečno na osmih nukleotidnih mestih, kar predstavlja približno 1,5 % nukleotidno raznolikost, medtem ko se pripadniki črne rase med seboj razlikujejo na obeh področjih povprečno kar na 14 nukleotidnih pozicijah (53). Raznolikost mDNA je od 5- do 10-krat višja med rasami kot znotraj posameznih ras, ki so med seboj precej podobne (54). Raznolikost znotraj črne rase je veliko večja kot znotraj azijske, belske in hispanske rase, po variabil-

nosti pa črnski rasi sledi azijska rasa (55, 56). Zaradi velike variabilnosti mDNA znotraj in med populacijami lahko s polimorfizmi mDNA ugotavljamo genetsko strukturo populacij, filogenetske odnose med njimi ter migracije in poselitev sveta z modernim človekom.

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

Mitohondrijski genom je zelo uporaben za določanje identitete starih posmrtnih ostankov in preučevanje genealoških odnosov, saj lahko kot referenčni vzorec uporabimo tudi nekaj generacij oddaljene sorodnike po materini liniji (59). Z genetskimi preiskavami so znanstveniki odgovorili na eno najvznemirljivejših ugank francoske zgodovine. S tipizacijo mDNA so identifikirali francoskega prestolonaslednika Ludvika XVII., čigar srce je po usmrtitvi izrezal zdravnik in se je ohranilo vse do danes (slika 3). Iz preko 200 let starega srca pridobljen haplotip mDNA so primerjali s haplotipom mDNA las Marije Antoinette in njenih še živečih potomcev po materini liniji. Z identičnostjo haplotipov so dokazali, da je bil desetletni deček, ki je leta 1795 umrl v ječi Temple, res sin Marije Antoinette (60, 61). Ta ugotovitev je ovrгла vse romantične zgodbe o tem, da so princa Ludvika z zamenjavo z drugim otrokom neznanca rešili iz ječe, in zgodbe vseh 43 avanturistov, ki so se v 19. stoletju razglašali za Ludvika XVII., med katerimi je bil najprepričljivejši pruski urar Naundorff. Tudi iz njegovih posmrtnih ostankov so izolirali mDNA in jo primerjali z mDNA



Slika 3. Identifikacija Ludvika XVII. Iz leve proti desni: Ludvik XVI., Ludvik XVII. in Marija Antoinetta.

las Marije Antoinette in mDNA dveh njenih še živečih sorodnikov po materini liniji. Ne ujemanje mitohondrijskih sekvenc potrjuje, da Naundorff ni bil sin Marije Antoinette.

S pomočjo polimorfizmov mDNA in primerjavo s še živečimi sorodniki po materini liniji so identificirali tudi skeletne ostanke Martina Bormanna, enega najradikalnejših Hitlerjevih sodelavcev, in skeletne ostanke slovitega ameriškega gangsterja Jesseja Jamesa, stare več kot 115 let (62, 63). Molekulargenetške analize 400 let starih skeletnih ostankov princa Branciforte Barresija iz Sicilije, 5.000 let starega tirolskega ledenega človeka Oetzija, neandertalca, najdenega v zahodni Nemčiji, in mnoge druge molekulargenetške analize starodavnih antropoloških bioloških materialov so pokazale, da je mogoče pridobiti mDNA iz zelo starih človeških ostankov (64–67). Mitohondrijsko DNA so izolirali iz človeških skeletov in mumificiranih mehkih tkiv različnih muzejskih in arheoloških zbirk, pri egipčanskih mumijah je bila uspešna tudi ekstrakcija jedrne DNA (68). Prav tako so uspešno izolirali mDNA 40.000 let starega mamuta, najdenega v Sibiriji, in potrdili njegovo sekvencno sorodnost z današnjim slonom. Najstarejšo uspešno izolacijo DNA pa predstavlja DNA iz kloroplastov 17–20 milijonov let starih fosiliziranih listov magnolije. Avtentičnost te DNA je potrdila natančna primerjava fragmentov DNA z moderno magnolijo (69).

Stopnja identifikacije, ki jo dosegamo s preiskavo mDNA, je zaradi odsotnosti rekombinacije veliko nižja od stopnje identifikacije, ki jo dosegamo s preiskavo jedrne avtosomske DNA. S tipizacijo mDNA lahko identificiramo le maternalno (materino ali žensko) linijo, medtem ko mikrosateliti jedrne avtosomske DNA omogočajo individualizacijo posameznika. Če primerjamo diskriminacijsko moč (moč razlikovanja med nesorodnimi

osebami) mDNA z jedrno avtosomsko DNA, vidimo, da je stopnja identifikacije posameznika z jedrno avtosomsko DNA praktično 100% (običajno večja kot 99,9999%), stopnja identifikacije maternalne linije s tipizacijo področij HVI in HVII mDNA pa je 98,8%, kar pomeni, da je v slovenski populaciji verjetnost naključnega ujemanja haplotipov mDNA med sorodstveno nepovezanimi osebami 1,2% (5).

Veliko molekulargenetških identifikacij je opravljenih s preiskavo več različnih genetskih označevalcev (avtosomski mikrosateliti, mikrosateliti, vezani na kromosom Y in mDNA). Tako so s tipizacijo jedrne in mitohondrijske DNA identificirali zob nemškega cesarja Wilhelma II., brata Reinholda Messnerja in slavnega astronoma Nikolaja Kopernika ter preverjali sorodstveno povezanost skeletov, ki datirajo v 7. stoletje (70–73). Z jedrno in mitohondrijsko DNA so identificirali leta 1960 pokopane člane gverilske organizacije Che Guevara v Boliviji in 50 let stare skeletne ostanke pilota Jamesa B. McGoverna (74, 75). S preiskavo jedrne in mitohondrijske DNA poteka identifikacija skeletnih ostankov ameriških vojakov, padlih v vojnah v Vietnamu, Kambodži, Laosu in na Kitajskem, v korejski vojni, v I. in II. svetovni vojni ter identifikacija domobranskih žrtev v Sloveniji (9, 10, 76–79).

Ena najodmevnejših molekulargenetških identifikacij skeletnih ostankov, pri kateri je bilo mogoče tipizirati več genetskih označevalcev, je bila prav gotovo identifikacija ruske vladarske družine Romanov, ki so jo pobili po februarjski revoluciji leta 1917. Za pozitivno identifikacijo je bilo treba analizirati tako jedrno kot mitohondrijsko DNA (80–83). S pomočjo jedrne DNA so lahko preverili maternalno in paternalno povezanost družinskih članov v grobišču, niso pa mogli odgovoriti na vprašanje, ali gre dejansko za posmrtno ostanke družine Romanov. Jedrna DNA namreč omogoča le preverjanje bližnjih sorod-

stvenih odnosov, preverjanje sorodnosti med daljnimi sorodniki, ki so med seboj nekaj generacij oddaljeni, pa zaradi rekombinacije ni mogoče. Preverjanje daljnih sorodstvenih povezav je mogoče z analizo mDNA, saj se ta deduje po materi in se ne rekombinira, ter z analizo mikrosatelitov kromosoma Y, ki se prenaša z očeta na sina v nespremenjeni obliki. Pri družini Romanov so preverili identičnost skeletnih ostankov tako, da so nukleotidna zaporedja mDNA primerjali z nekaj generacij oddaljenimi, še živečimi potomci po materini liniji. Referenčna oseba za identifikacijo carice Aleksandre in njenih otrok je bil princ Filip, vojvoda Edinburški, pranečak carice Aleksandre in mož angleške kraljice Elizabete II. Njegova mDNA je bila identična caričini in otroškim. Še živeči referenčni osebi za identifikacijo carja Nikolaja sta bila vnuk in vnukinja Luise Hesse Cassel. Pri carju Nikolaju se sekvenca haplotipa mDNA na eni nukleotidni poziciji ni ujemala s še živečimi sorodniki po materini liniji, zato so opravili dodatne primerjave carja Nikolaja s posmrtnimi ostanki carjevega brata Georgija Romanova, ki je umrl za tuberkulozo leta 1899 in so ga za potrebe te analize ekshumirali iz katedrale svetega Petra in Pavla v Sankt Peterburgu ter potrdili popolno identičnost nukleotidnih zaporedij mDNA (81). Z analizo jedrne in mitohondrijske DNA so dokazali, da posmrtni ostanki v domnevnem grobišču družine Romanov dejansko pripadajo tej družini. V grobišču so našli posmrtno ostanko carja Nikolaja II, carice Aleksandre, treh njenih otrok, treh služabnikov in družinskega zdravnika. Car in carica sta imela štiri hčerke in sina. Vsi trije najdeni otroški skeleti so bili ženskega spola. V grobišču sta torej manjkali trupli sina in ene od hčera (80). Identifikaciji Romanovih je sledila genetska preiskava biološkega materiala pokojne Ane Anderson Manahan, ki je vse do svoje smrti leta 1984 v ZDA trdila, da je Anastazija Romanov (biopsijski vzorec črevesnega tkiva, ki so ga odvzeli Andersonovi leta 1979 in je bil shranjen v eni od bolnišnic v Virginiji). Genetska povezanost Andersonove z Romanovimi je bila ovržena (82). Pred približno dvema letoma pa je bila uganka Romanovih končno rešena, saj so našli manjkajoča otroška skeleta le 70 m proč od grobišča, kjer so leta 1991 izkopali

posmrtno ostanko večine članov družine Romanovih. Genetska analiza je potrdila, da najdena otroška skeleta pripadata manjkajočemu sinu in eni od hčera (83).

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

PRIHODNOST FORENZIČNIH GENETSKIH PREISKAV

Naj zaključimo s pregledom možnosti forenzičnih genetskih preiskav v prihodnosti. Današnje preiskave jedrne DNA in mDNA, ki temeljijo na analizi nevtralnih odsekov, ne nosijo nobene informacije o vidnih karaktere-

ristikah posameznika (barva oči, las, kože, telesna višina) in omogočajo le ugotavljanje identitete. Edina vidna karakteristika, ki jo lahko določimo, je spol. Prihodnost genetskih preiskav v forenziki pa je prav gotovo v tem, da bi lahko poleg individualizacije neke sledi iz nje z določeno zanesljivostjo razbrali tudi fizične karakteristike oz. vidne lastnosti posameznika. Najnovejše raziskave nam nakazujejo možnost ugotavljanja vidnih znakov posameznika iz bioloških sledov v prihodnosti. Pri genu za receptor melanokortin 1 so nekatere mutacije povezane s fenotipom rdeče barve las, kar pomeni, da bi lahko bili določeni polimorfizmi indikatorji za rdečo barvo las (85). Znotraj genov, ki so povezani s pigmentacijo pri človeku, so odkrili enonukleotidne polimorfizme, s pomočjo katerih lahko

z določeno zanesljivostjo (ki pa ni 100%) določimo barvo oči, las in kože (86–88). Enonukleotidne polimorfizme, s pomočjo katerih lahko napovemo etnično pripadnost, barvo oči, las in kože, so preiskovali pri starodavnih človeških skeletnih ostankih iz bronaste in železne dobe ter pri neandertalcih (89, 90). Le nekaj držav po svetu, npr. Nizozemska, ima zakonodajo, ki v pravosodju eksplicitno omogoča uporabo DNA za določanje fenotipskih lastnosti, pri čemer je dovoljeno le določanje zunanjih vidnih karakteristik posameznika, ne pa tudi nagnjenosti k boleznim ali določenim vedenjskim deviacijam. V nekaterih pravosodnih sistemih pa je trenutno še vedno dovoljeno preiskovati le nekodogena področja DNA.

LITERATURA

1. Zupanič I, Balažič J, Komel R. Analysis of nine short tandem repeat (STR) loci in the Slovenian population. *Int J Legal Med.* 1998; 111 (5): 248–50.
2. Zupanič I. Uvedba preiskave DNA za prepoznavanje oseb in preverjanje sorodstvenih povezav v slovenski populaciji [magistrska naloga]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 1999.
3. Šterlinko H, Zupanič Pajnič I, Balažič J, et al. Human Y-specific STR haplotypes in a Slovenian population sample. *Forensic Sci Int.* 2001; 120 (3): 226–8.
4. Zupanič Pajnič I, Balažič J, Komel R. Sequence polymorphism of the mitochondrial DNA control region in the Slovenian population. *Int J Legal Med.* 2004; 118 (1): 1–4.
5. Zupanič Pajnič I. Identifikacija oseb iz starih in slabo ohranjenih bioloških materialov s polimorfizmi mitohondrijske DNA [doktorsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2007.
6. Zupanič-Pajnič I. Molekularno genetska identifikacija žrtev medvojnih pobojev pod Storžičem. In: Dežman J, ed. Poročilo Komisije vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč 2005–2008. Ljubljana: Družina; 2008. p. 219–50.
7. Zupanič-Pajnič I. Preliminarno poročilo molekularno genetske identifikacije okostij iz grobišča pri Konfinu 1. In: Dežman J, ed. Poročilo Komisije vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč 2005–2008. Ljubljana: Družina; 2008. p. 147–74.
8. Zupanič-Pajnič I. Priporočila za molekularno genetsko identifikacijo žrtev povojnih pobojev v Sloveniji. In: Dežman J, ed. Poročilo Komisije vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč 2005–2008. Ljubljana: Družina; 2008. p. 133–46.
9. Zupanič-Pajnič I. Molekularno genetska identifikacija domobranskih žrtev. *Zdrav Vestn.* 2008; 77 (11): 745–50.
10. Zupanič-Pajnič I, Gornjak-Pogorelec B, Balažič J. Molecular genetic identification of skeletal remains from the Second world war Konfin I mass grave in Slovenia. *Int J Legal Med.* 2010; 124 (4): 307–17.
11. Graham EAM. DNA reviews: Ancient DNA. *Forensic Sci Med Pathol.* 2007; 3 (3): 221–5.
12. Zupanič Pajnič I, Šterlinko H, Balažič J, et al. 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.
13. Zupanič I. Genetski detektivi: prepoznavanje oseb in preverjanje sorodstvenih povezav s pomočjo preiskave DNA. *Proteus.* 1998; 60 (9–10): 400–5.
14. Zupanič-Pajnič I. Molekularno genetska (DNK) identifikacija bioloških sledi. In: Odvetniška zbornica Slovenije. *Odvetniška šola*; 2010 Apr 9; Bernardin: Odvetniška zbornica Slovenije; 2010. p. 71–3.

15. Zupanič Pajnič I. Molekularno genetska identifikacija neznanih trupel iz skeletnih ostankov in zob. In: Luzar B, Poljak M, Glavač D, et al, eds. Molekularna diagnostika v medicini. 15. spominsko srečanje akademika Janeza Miličinskega in 36. memorialni sestanek profesorja Janeza Plečnika in 1. srečanje slovenskega društva za humano genetiko z mednarodno udeležbo; 2005 Nov 30–Dec 2; Ljubljana. Ljubljana: Medicinska fakulteta; 2005. p. 73–84.
16. Zupanič-Pajnič I, Balažič J, Komel R, et al. Identifikacija tkivnih vzorcev z molekularno biološkimi metodami. *Onkologija*. 2002; 6 (1): 17–20.
17. Gornjak-Pogorelc B, Jazbec J, Zupanič-Pajnič I, et al. Molekularno genetska analiza himerizma po alogenski transplantaciji kostnega mozga. In: Luzar B, Poljak M, Glavač D, et al, eds. Molekularna diagnostika v medicini. 15. spominsko srečanje akademika Janeza Miličinskega in 36. memorialni sestanek profesorja Janeza Plečnika in 1. srečanje slovenskega društva za humano genetiko z mednarodno udeležbo; 2005 Nov 30–Dec 2; Ljubljana. Ljubljana: Medicinska fakulteta; 2005. p. 29–41.
18. Herrmann B, Hummel S. Ancient DNA: recovery and analysis of genetic material from paleontological, archeological, museum, medical, and forensic specimens. Berlin: Springer-Verlag; 1994.
19. Hummel S. Ancient DNA typing: methods, strategies and applications. Berlin: Springer-Verlag; 2002.
20. Jeffreys AJ. DNA typing: approaches and applications. *J Forensic Sci Soc*. 1993; 33 (4): 204–11.
21. Morling N. Forensic genetics. *Lancet*. 2004; 364 Suppl 1: s10–1.
22. Primorac D, Marjanović D. Analiza DNA u sudskoj medicine I pravosuđu. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
23. Jeffreys AJ, Brookfield JFY, Semeonoff R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*. 1985; 317 (6040): 818–9.
24. Mukaida M, Kimura H, Takada Y, et al. The personal identification of many samples recovered from under the sea. *Forensic Sci Int*. 2000; 113 (1–3): 79–85.
25. Olaisen B, Stenersen M, Mevag B. Identification by DNA analysis of the victims of the august 1996 Spitsbergen civil aircraft disaster. *Nature Genet*. 1997; 15 (4): 402–5.
26. Sajantila A, Strom M, Budowle B, et al. The polymerase chain reaction and post-mortem forensic identity testing: application of amplified D1S80 and HLA-DQ α loci to the identification of fire victims. *Forensic Sci Int*. 1991; 51 (1): 23–34.
27. Graham EAM. Disaster victim identification. *Forensic Sci Med Pathol*. 2006; 2 (3): 203–7.
28. Biesecker LG, Bailey-Wilson JE, Ballantyne J, et al. Epidemiology. DNA identification after the 9/11 World Trade Center attack. *Science*. 2005; 310 (5751): 1122–3.
29. Prinz M, Carracedo A, Mayr WR, et al. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victims identification (DVI). *Forensic Sci Int Genet*. 2007; 1 (1): 3–12.
30. Beauchier JP, De Valck E, Lefevre P, et al. Mass disaster victim identification: the tsunami experience. *Open Forensic Sci J*. 2009; 2: 54–62.
31. Davoren J, Vanek D, Konjhodžić R, et al. Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. *Croat Med J*. 2007; 48 (4): 478–85.
32. Jakovski Z, Nikolova K, Jenesa B, et al. Forensic DNA analysis in the identification of human remains in mass graves. *J Clin Path Forensic Med*. 2010; 1 (1): 1–4.
33. Jeffreys AJ, Allen MJ, Hagemberg E, et al. Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. *Forensic Sci Int*. 1992; 56 (1): 65–76.
34. Scharf SJ, Smith AG, Hansen JA, et al. Quantitative determination of bone marrow transplant engraftment using fluorescent polymerase chain reaction primers for human identity markers. *Blood*. 1995; 85 (7): 1954–63.
35. Jobling MA, Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet*. 2004; 5 (10): 739–51.
36. Butler JM. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J Forensic Sci*. 2006; 51 (2): 253–65.
37. Benecke M. DNA typing in forensic medicine and in criminal investigations: a current survey. *Naturwissenschaften*. 1997; 84 (5): 181–8.
38. Brenner CH. DNA-VIEW 2007 User Guide. Oakland (CA); 2007.
39. Gusmao L, Butler JM, Carracedo A, 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 (4): 191–200.
40. Walsh B, Redd AJ, Hammer MF. Joint match probabilities for Y chromosomal and autosomal markers. *Forensic Sci Int*. 2008; 174 (2–3): 234–8.
41. Willuweit S, Roewer L, International Forensic Y Chromosome User Group. Y chromosome haplotype reference database (YHRD): update. *Forensic Sci Int Genet*. 2007; 1 (2): 83–7.
42. Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, et al. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *BioTechniques*. 1993; 15 (4): 636–41.
43. Buel E, Wang G, Schwartz M. PCR amplification of animal DNA with human X-Y amelogenin primers used in gender determination. *J Forensic Sci*. 1995; 40 (4): 641–4.

44. LaFountain M, Schwartz M, Cormier J, et al. Validation of capillary electrophoresis for analysis of the X-Y homologous amelogenin gene. *J Forensic Sci.* 1998; 43 (6): 1188–94.
45. Foster EA, Jobling MA, Taylor PG, et al. Jefferson fathered slave's last child. *Nature.* 1998; 396 (6706): 27–8.
46. Alaedddini R, Walsh SJ, Abbas A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA – A review. *Forensic Sci Int Genet.* 2010; 4 (3): 148–57.
47. Hopwood AJ, Mannucci A, Sullivan KM. DNA typing from human faeces. *Int J Legal Med.* 1996; 108 (5): 237–43.
48. Tully G, Bär W, Brinkmann B, 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; 124 (1): 83–91.
49. Sigurdardottir S, Helgason A, Gulcher JR, et al. The mutation rate in the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet.* 2000; 66 (5): 1599–609.
50. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981; 290 (5806): 457–65.
51. Vallone PM, Just RS, Coble MD, et al. A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *Int J Legal Med.* 2004; 118 (3): 147–57.
52. Piercy R, Sullivan KM, Benson N, et al. The application of mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian genetic identification. *Int J Legal Med.* 1993; 106 (2): 85–90.
53. Bär W, Brinkmann B, Budowle B, 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.
54. Allen M, Engström AS, Meyers S, et al. Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities. *J Forensic Sci.* 1998; 43 (3): 453–64.
55. Horai S, Hayasaka K. Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet.* 1990; 46 (4): 828–42.
56. Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature.* 1987; 325 (6099): 31–6.
57. Castella V, Dimo-Simonin N, Brandt-Casadevall C, et al. Forensic identification of urine sample: a comparison between nuclear and mitochondrial DNA markers. *Int J Legal Med.* 2006; 120 (2): 67–72.
58. Parson W, Dür A. EMPOP – A forensic mtDNA database. *Forensic Sci Int Genet.* 2007; 1 (2): 88–92.
59. Fisher DL, Holland MM, Mitchell L, et al. Extraction evaluation and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States civil war bone. *J Forensic Sci.* 1993; 38 (1): 60–8.
60. Jehaes E, Decorte R, Peneau A, et al. Mitochondrial DNA analysis on remains of a putative son of Louis XVI, King of France and Marie-Antoinette. *Europ J Hum Genet.* 1998; 6 (4): 383–95.
61. Jehaes E, Toprak K, Vanderheyden N, 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 (3): 135–41.
62. Anslinger K, Weichhold G, Keil W, et al. Identification of the skeletal remains of Martin Bormann by mtDNA analysis. *Int J Legal Med.* 2001; 114 (3): 194–6.
63. Stone AC, Starrs JE, Stoneking M. Mitochondrial DNA analysis of the presumptive remains of Jesse James. *J Forensic Sci.* 2001; 46 (1): 173–6.
64. Rickards O, Martinez-Labarga C, Favaro M, et al. DNA analyses of the remains of the Prince Branciforte Barresi family. *Int J Legal Med.* 2001; 114 (3): 141–6.
65. Handt O, Richards M, Trommsdorff M, et al. Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science.* 1994; 264 (5166): 1775–8.
66. Ermini L, Olivieri C, Rizzi E, et al. Complete mitochondrial genome sequence of the Tyrolean Iceman. *Curr Biol.* 2008; 18 (21): 1687–93.
67. Krings M, Stone A, Schmitz RW, et al. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell.* 1997; 90 (1): 19–30.
68. Paabo S. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature.* 1985; 314 (6012): 644–5.
69. Golenberg EM, Giannasi DE, Clegg MT, et al. Chloroplast DNA sequence from a miocene *Magnolia* species. *Nature.* 1990; 344 (6267): 656–8.
70. Pfeiffer H, Benthous S, Rolf B, et al. The Kaiser's tooth. *Int J Legal Med.* 2003; 117 (2): 118–20.
71. Parson W, Brandstätter A, Niederstätter H, et al. Unravelling the mystery of Nanga Parbat. *Int J Legal Med.* 2006; 121 (4): 309–10.
72. Bogdanowicz W, Allen M, Branicki W, et al. Genetic identification of putative remains of the famous astronomer Nicolaus Copernicus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106 (30): 12279–82.
73. Vanek D, Saskova L, Koch H. Kinship and Y-chromosome analysis of 7th century human remains: Novel DNA extraction and typing procedure for ancient material. *Croat Med J.* 2009; 50 (3): 286–95.
74. Lleonart R, Riggo E, Sainz de la Pena MV, 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.

75. Irwin JA, Edson SM, Loreille O, et al. DNA identification of »Earthquake McGoon« 50 years postmortem. *J Forensic Sci.* 2007; 52 (5): 1115–8.
76. Irwin JA, Leney MD, Loreille O, et al. Application of low copy number STR typing to the identification of aged, degraded skeletal remains. *J Forensic Sci.* 2007; 52 (6): 1322–7.
77. Lee HY, Kim NY, Park MJ, et al. DNA typing for the identification of old skeletal remains from Korean war victims. *J Forensic Sci.* 2010; 55 (6): 1422–9.
78. Lee HY, Park MJ, Kim NY, et al. Simple and highly effective DNA extraction method from old skeletal remains using silica columns. *Forensic Sci Int Genet.* 2010; 4 (5): 275–80.
79. Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, et al. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains. Identification of remains from the Vietnam war. *J Forensic Sci.* 1993; 38 (3): 542–53.
80. Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, et al. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet.* 1994; 6 (2): 130–5.
81. Ivanov PI, Wadhams MJ, Roby RK, et al. 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 (4): 417–20.
82. Gill P, Kimpton C, Aliston-Greiner R, et al. Establishing the identity of Anna Anderson Manahan. *Nat Genet.* 1995; 9 (1): 9–10.
83. Coble MD, Loreille OM, Wadhams MJ, et al. Mystery Solved: The Identification of the Two Missing Romanov Children Using DNA Analysis. *PLoS ONE* [internet]. 2009 [citirano 2011 Jun 25]; 4: e4838. Dosegljivo na: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0004838>
84. Zupanič Pajnič I. Visoko učinkovita metoda ekstrakcije DNA iz skeletnih ostankov. *Zdrav Vestn.* 2011; 80 (3): 171–81.
85. Grimes EA, Noake PJ, Dixon L, et al. Sequence polymorphisms in the human melanocortin 1 receptor gene as an indicator of the red hair phenotype. *Forensic Sci Int.* 2001; 122 (2–3): 124–9.
86. Liu F, van Duijn K, Vingerling JR, et al. Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. *Curr Biol.* 2009; 19 (5): 192–3.
87. Valenzuela R, Henderson M, Walsh M, et al. Predicting phenotype from genotype: normal pigmentation. *J Forensic Sci.* 2010; 55 (2): 315–22.
88. Valverde P, Healy E, Jackson I, et al. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet.* 1995; 11 (3): 328–30.
89. Bouakaze C, Keyser C, Crubézy E, et al. Pigment phenotype and biogeographical ancestry from ancient skeletal remains: Inferences from multiplex autosomal SNP analysis. *Int J Legal Med.* 2009; 123 (4): 315–25.
90. Lalueza-Foc C, Rompler H, Caramelli D, et al. A melanocortin 1 receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals. *Science.* 2007; 318 (5855): 1453–5.

Prispelo 15. 3. 2011