

Irena Zupanič Pajnič¹

Molekularnogenetska identifikacija skeletnih ostankov

Molecular Genetic Identification of Skeletal Remains

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: skeletni ostanki, kratke tandemske ponovitve, mitohondrijska DNA, množična grobišča, druga svetovna vojna

Prispevek na pregleden način predstavlja osnove genetskih preiskav DNA, pridobljene iz skeletiziranih človeških posmrtnih ostankov na primeru molekularnogenetskih identifikacij žrtev druge svetovne vojne, ki jih opravljamo v Laboratoriju za molekularno genetiko Inštituta za sodno medicino Medicinske fakultete v Ljubljani. V prispevku podajamo lastnosti DNA, pridobljene iz starih kosti in zob, ter dejavnike, ki vplivajo na njeno ohranitev. Opisana so priporočila za izkop in shranjevanje posmrtnih ostankov za nadaljnjo genetsko identifikacijo, priporočila za zbiranje vzorcev še živečih sorodnikov in oseb za eliminacijsko podatkovno zbirko ter priporočila za molekularnogenetsko identifikacijo skeletnih ostankov. Natančno opredeljujemo, katere kosti in zobje so najprimernejši za genetske preiskave in kakšni so ukrepi za preprečevanje kontaminacije endogene DNA kosti in zob. Opisan je postopek ekstrakcije genske DNA, postopek določitve količine DNA v vzorcu, postopki za pridobitev genetskih profilov avtosomske jedrne DNA, haplotipov kromosoma Y in haplotipom mitohondrijske DNA ter metode statističnega ovrednotenja verjetnosti sorodstvenih povezav ob ujemanju genetskih profilov kosti ali zob s še živečimi sorodniki.

ABSTRACT

KEY WORDS: skeletal remains, short tandem repeat, mitochondrial DNA, mass graves, World War II

This review article describes genetics investigations of DNA from human skeletal remains. In the molecular genetic laboratory at the Institute of Forensic Medicine, molecular genetic identifications of the World War II mass grave victims are performed. The characteristics of ancient DNA and the environmental factors which affect its preservation are described. The recommendations for excavation, storage and molecular genetic identification of skeletal remains are presented. Reference samples from relatives and samples for the elimination database are collected and analyzed for each mass grave. The most appropriate type of bones and teeth for genetic analyses are described and the measures for preventing contamination are listed. Procedures for DNA extraction, DNA quantification, DNA typing of autosomal microsatellites, Y chromosome microsatellites and mitochondrial DNA are described and statistical calculations of match probability are exposed.

¹ Viš. znan. sod. 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

V živi celici encimski procesi skrbijo za to, da ostaja DNA neokrnjena (1). Po smrti organizma se ravnovesje v celici poruši in DNA je izpostavljena razgradnji z nukleazami celičnih lizosomov ter razgradnji z bakterijami in glivami, ki se prehranjujejo z makromolekulami (2). Ob vezavi DNA na mineralno osnovo kosti in zob se encimska in mikrobnna razgradnja upočasnjuje, zato se lahko DNA ohrani tudi v zelo starih skeletnih ostankih. Vendar je pogosto razgrajena na fragmente, katerih dolžina je med 100 in 500 baznih parov (bp) (3, 4). Ohranjenost DNA v skeletnih ostankih s starostjo pada, vendar vedno temu ni tako, saj na ohranitev DNA v največji meri vpliva okolje, v katerem se skeletni ostanki nahajajo (4–6). Najpomembnejši dejavniki okolja so temperatura, vlažnost, pH, kemijske lastnosti zemlje in prisotnost mikroorganizmov. Hitra izsušitev posmrtnih ostankov omogoča boljše ohranitev DNA, prav tako na ohranitev DNA pozitivno vpliva nizek nivo izpostavljenosti ultravijoličnemu (UV) sevanju. DNA se bolje ohrani v zemlji z visoko koncentracijo soli, nevtralnimi ali rahlo bazičnim pH, nizko vsebnostjo huminskih kislin in nizko vlažnostjo (1, 7, 8). Ključni dejavnik ohranitve DNA pa je vsekakor temperatura okolice, v kateri so se skeletni ostanki nahajali od smrti organizma do izkopa oziroma do molekularnogenetskih preiskav. Nizke povprečne letne temperature omogočajo najboljšo ohranitev DNA, zato najdemo najboljše ohranjeno DNA v bioloških vzorcih, najdenih v jamah in trajno zamrznjenih tleh (9, 10). Na količino in kakovost DNA v skeletnih ostankih pa vpliva tudi način njihovega shranjevanja po izkopu (11, 12). Uspešnost genetske tipizacije je večja pri sveže izkopanih skeletih kot pri skeletih, ki so bili več let shranjeni pri sobni temperaturi (npr. v muzejskih zbirkah), zlasti zaradi višjih temperatur okolice in umivanja skeletnih ostankov pred njihovim shranjevanjem, kar zmanjša pH in koncentracijo soli v kosteh. Za čim daljšo ohranitev DNA v skeletnih ostankih je najprimernejše njihovo zamrzovanje (13). Za molekularnogenetske preiskave so najprimernejše dolge kosti in zobje, v katerih se DNA najdlje ohrani (14–16).

Zaradi močno razgrajene DNA, pridobljene iz skeletnih ostankov, so molekularnoge-

netske preiskave zasnovane na zelo kratkih polimorfnihih odsekih jedrne in mitohondrijske DNA (mDNA). Tipi polimorfizmov, ki jih preiskujemo, so natančno opisani v tretji številki 50. letnika Medicinskih razgledov (17). Poleg avtosomskih mikrosatelitov in mikrosatelitov, vezanih na kromosom Y, se poslužujemo tudi preiskav sekvenčnih polimorfizmov kontrolne regije mitohondrijske DNA. Ta se v celici nahaja v številnih kopijah, kar ji omogoča daljšo ohranitev v starih skeletnih ostankih v primerjavi z jedrno DNA (4, 18–20). V metabolno aktivnih celicah najdemo od 1.000 do 10.000 molekul mDNA. Krožna oblika in mitohondrijska ovojnica ščitita mDNA pred razgradnjo z eksonukleaznimi encimi, zato je manj podvržena razgradnji kot jedrna DNA (21). Mitohondrijska DNA se pri človeku deduje po materi in se za razliko od kromosoma Y, ki se deduje po očetu (sledimo lahko očetovi liniji), prenese na vse njene potomce ne glede na spol, kar nam omogoča sledenje materini liniji. Zaradi odsotnosti rekombinacije in dedovanja po materi oz. očetu imajo osebe z enakimi zaporedji nukleotidov mDNA skupnega ženskega prednika in osebe z enakimi haplotipi kromosoma Y skupnega moškega prednika (22). To je osnova za identifikacijo skeletnih ostankov s pomočjo analize mDNA in kromosoma Y. Stopnja identifikacije, ki jo dosežemo s preiskavo mDNA in s preiskavo mikrosatelitov kromosoma Y, je zaradi odsotnosti rekombinacije veliko nižja od stopnje identifikacije, ki jo dosežemo s preiskavo mikrosatelitov avtosomske jedrne DNA. S tipizacijo mDNA in kromosoma Y lahko identificiramo le maternalno in paternalno linijo, medtem ko nam mikrosateliti avtosomske jedrne DNA omogočajo individualizacijo posameznika. Zato preiskujemo pri identifikaciji starih skeletnih ostankov, če je to le mogoče, tako polimorfizme jedrne DNA (avtosome in kromosom Y) kot polimorfizme mDNA (23).

Pri tipizaciji DNA starih skeletnih ostankov se poleg močno razgrajene DNA srečujemo tudi z zelo majhnimi količinami endogene DNA, ki jo težko razlikujemo od veliko pogostejše sodobne (eksogene) DNA. Prav ta kontaminacija je resen problem pri preiskavah DNA, pridobljene iz starih skeletnih ostankov (3, 24–27). Do kontaminacije endo-

gene DNA kosti in zob s sodobno DNA lahko pride ob izkopu, ob neprimernem shranjevanju skeletnih ostankov ter ob antropoloških in molekularnogenetskih preiskavah (28). Zato je treba upoštevati priporočila za preprečevanje kontaminacije in kriterije, ki potrjujejo verodostojnost pridobljenih genetskih profilov (4, 29). Zelo pomembno je, da vzporedno z vzorci kosti in zob testiramo tudi ekstrakcijske in pomnoževalne negativne kontrole ter osebe, ki je sodelovalo pri izkopu, shranjevanju in antropoloških ter genetskih preiskavah, kar nam omogoča sledenje kontaminaciji v primeru, da do nje pride. Za posamezen skelet je treba tipizirati vsaj dva vzorca in iz obeh je treba pridobiti identične genetske profile (30).

Molekularnogenetske identifikacije skeletnih ostankov bomo prikazali na primeru žrtev povojnih množičnih pobojev v Sloveniji iz časa druge svetovne vojne. Komisija Vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč je v zadnjih letih evidentirala preko 600 grobišč iz tega obdobja (31). Natančnih podatkov o številu žrtev v grobiščih ni, po mnenju zgodovinarja Jožeta Dežmana naj bi jih bilo okoli 100.000. Za večino grobišč ni nobenih dokumentov, na osnovi katerih bi lahko opravili molekularnogenetsko identifikacijo. Izjemo predstavljajo redka grobišča, največje med njimi je grobišče pri breznu Konfin I, za katerega je bilo mogoče iz ohranjenih arhivskih virov sestaviti seznam 88 žrtev (32). V Laboratoriju za molekularno genetiko Inštituta za sodno medicino smo genetsko obdelali in pozitivno identificirali žrtve treh grobišč, za katera so bili na razpolago poimenski sezname žrtev, na osnovi katerih smo lahko zbrali primerjalne vzorce ustnih sluznic še živčih sorodnikov. To so grobišča Konfin I, Storžič in Bodoveljska grapa. Za Konfin I smo pozitivno identificirali 32 žrtev, za Storžič 3 žrtve in za Bodoveljsko grapo 7 žrtev (23, 33–37).

SKLETIZIRANI POSMRтни OSTANKI

Zobje

V primerjavi s kostmi je DNA v zobeh bolj zaščiten, saj predstavljajo trda zobna tkiva, ki obdajajo pulpno votlino, fizično zaščito zob-

ne pulpe (38). Trda zobna tkiva se ohranijo v številnih ekstremnih okoljih, saj niso podvržena hitri razgradnji po zakopu, raztapljanju v vodi in prenesejo temperaturo do 1.100 °C (39). Garcia s sodelavci je preučeval vpliv okolja na razgradnjo DNA v zobeh in ugotovil, da pride do razgradnje DNA najhitreje v vodi, nato v zemlji, najpočasneje pa na zraku (40). V starih zobeh je DNA izredno stabilna, saj je, podobno kot v starih kosteh, vezana na hidroksiapatit (41).

Najbogatejši vir DNA v zobeh predstavlja zobna pulpa. Ta je v pulpni votlini dobro zaščiten, vse dokler je zob trdno zasidran v alveolni kosti. Če je zob shranjen v suhem okolju, pride do dehidracije zobne pulpe in mumifikacije, kar zaustavi nekrotične in gnilobne procese in omogoča dobro ohranjenost DNA. Če obehalni aparat zoba popusti in je mikrookolje vlažno, pulpa hitro zgine. Tako že tri tedne po pokopu zoba v zemljo Schwartz zaradi uničenja zobne pulpe ni več uspel pridobiti jedrnega profila, Pfeiffer pa ugotavlja 90 % zmanjšanje količine jedrne DNA po šestih tednih v zemlji (38, 42). V primerih, ko je posmrtni interval dolg in je verjetnost razgradnje zobne pulpe velika, lahko opravimo tipizacijo mDNA, katere glavni vir je dentin – ostanki podaljškov odontoblastov v dentinskih kanalih, pa tudi cementociti v cementu (43, 44). Največ DNA dobimo iz zoba, če cel zob zmeljemo, saj zajamemo tudi DNA, ki se nahaja v trdih zobnih tkivih (39). Količina DNA je odvisna od velikosti zobne pulpe oziroma skupine zob, zato so kočniki najbogatejši vir DNA. Za izolacijo DNA si zobje po primernosti sledijo v naslednjem vrstnem redu: endodontsko nezdravljeni kočnik, ličnik, podočnik in sekalec ter endodontsko zdravljeni kočnik, ličnik, podočnik in sekalec (45). Za identifikacijo žrtev množičnih grobišč Boles s sodelavci priporoča uporabo zob, saj je te lažje transportirati kot kosti in omogočajo pridobitev kakovostne genomske DNA (46).

Mörnstad je je v dveh ločenih postopkih izoliral DNA iz zobne pulpe in dentina in pri preiskovancih ugotavljal vpliv kronološke starosti na količino mDNA v dentinu (47). Opazil je upadanje količine mDNA s starostjo, kar je v skladu z degenerativnimi starostnimi spremembami podaljškov odontoblastov in zapiranjem dentinskih kanalov s kristali

kalcijevega fosfata. Vendar tudi po razkroju podaljškov odontoblastov ostane v dentinu med kristali kalcijevega fosfata ujetje dovolj mDNA za uspešno molekularnogenetsko identifikacijo. Količina DNA v endodontsko zdravljenem – polnjenem zobu je 100-krat manjša kot v vitalnem zobu, vendar dovolj velika za uspešno pomnožitev z verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR). Prisotnost DNA v endodontsko oskrbljenem zobu kaže na prisotnost DNA v trdih tkivih zoba (dentin in cement), saj je bila zobna pulpa odstranjena. Prisotnost kariesa in plombirnih materialov na ekstrakcijo DNA in njeno pomnoževanje ne vpliva, zato plombirnih materialov pred mletjem zoba ni treba odstranjevati (39). V primeru eksplozij ali letalskih nesreč je pogosto treba opraviti molekularnogenetsko identifikacijo iz fragmentiranih zob.

Gaytmenn in Sweet sta ugotavljala, kateri del zoba vsebuje največ DNA (48). Zob sta v raziskavi razdelila na štiri dele: grizno in vratno polovico zobne krone ter na vratni dve tretjini korenine in apikalno tretjino korenine. Ugotovila sta, da je najvišja koncentracija DNA v vratnih dveh tretjinah korenine (zobna pulpa, dentin in cement), sledita vratni del krone (zobna pulpa, dentin in sklenina) ter apikalna tretjina korenine (zobna pulpa, dentin in cement), najmanj DNA pa je v grizni polovici krone (dentin, sklenina in morda divertikli zobne pulpe). Sama količina DNA se tako med posamezniki kot med skupinami zob močno razlikuje, količina in kakovost izolirane DNA pa je odvisna tudi od patološkega stanja zoba, zobozdravstvenih posegov, časa, ki je pretekel od ekstrakcije zoba do izolacije DNA, in starosti donorja (42). Tsuchimochi je z metodo Chelex uspešno izoliral genomsko DNA iz zob (zobne pulpe), ki jih je za 2 minuti izpostavil temperaturi 300 °C, zelo dobre rezultate pa je s to metodo dosegel tudi pri identifikaciji zoglenelih trupel (49). Pri izpostavljenosti zoba temperaturam 500 °C ali več je prišlo do karbonizacije zobne pulpe in posledičnega uničenja DNA. Sweet je pri zoglenelem truplu iz zobne pulpe neizraslega modrostnega zoba pridobil 1,35 µg DNA (50). Iz sveže izpuljenih in nepoškodovanih kočnikov, ki sta jih zmlela v prah, sta Sweet in Hildebrand ekstrahirala 0,5–97,5 µg DNA (pov-

prečno 30 µg), Schwartz pa 15–20 µg DNA (39, 42). Sweet je pridobil mikrosatelitski jedrni profil iz zob trupla, ki je bilo ekshumirano 3,5 let po pokopu, Alvarez Garcia pa iz zob, starih do 50 let (40, 51). Boles je iz zob trupel, izkopanih 10 let po pokopu, pridobil 10–50 ng DNA na posamezen zob in uspešno tipiziral mDNA (46). Baker je pridobil mDNA iz 3.000 let starih zob (52). V našem laboratoriju smo uspeli pridobiti 11 ng DNA/g zobnega prahu in kompletne jedrne genetske profile iz preko 300 let starih zob, izkopanih v Auzerspergovi kapeli na tržnici v Ljubljani (Rezultati še niso objavljeni).

Kosti

V kostnem tkivu se DNA nahaja v osteocitih, ki so obdani z mineralizirano kostno maso. V enem mm³ kosti je 20.000–26.000 osteocitov (53). Kostnina je tkivo, zgrajeno iz celic in medceličnine. Medceličnino sestavljajo organske (predvsem kolagen tipa I) in anorganske sestavine (najpogostejši so kalcijevi in fosfatni ioni, prisotni pa so še bikarbonatni, magnezijevi, kalijevi in natrijevi ioni). Kalcijevi in fosfatni ioni tvorijo kristale hidroksiapatita, iz katerih so plošče, ki ležijo vzdolž kolagenskih vlaken. Povezava kolagenskih vlaken s kristali zagotavlja trdnost in odpornost kostnine. Če kost dekalciniramo, sicer ohrani obliko, vendar postane mehka in upogljiva. Če pa odstranimo organsko medceličnino, kost prav tako ohrani obliko, vendar postane krhka in lomljiva (54). Kemp in Smith sta zagovornika hipoteze, ki pravi, da omogoča stabilnost DNA in njeno ohranitev v starih skeletnih ostankih vezava DNA na hidroksiapatit, ki predstavlja glavno kostno maso (55). Mehanizem vezave DNA na hidroksiapatit je negotov, predvidevajo pa, da se negativno nabite fosfatne skupine molekule DNA vežejo na hidroksilna mesta na hidroksiapatitu. To hipotezo potrjuje dejstvo, da se ob povečani degradaciji hidroksiapatita ohrani v kosti manj DNA. Močna vezava kolagenskih in nekolagenskih proteinov na hidroksiapatit prepreči razgradnjo hidroksiapatita, do katere bi sicer zaradi zunanjih vplivov (temperatura in različni kemijski dejavniki) lahko prišlo.

Za preiskavo DNA iz skeletnih ostankov so po mnenju Edsona s sodelavci najprimernejše dolge kosti, zlasti stegnenice in kosti

reber, sledijo golenice in kosti vretenc, medenične kosti, nadlahtnice, lopatice in čeljusti z zobmi, med najmanj primerne za genetske preiskave pa Edson s sodelavci šteje kosti lobanje (16). S primerjalno študijo uspešnosti tipizacije jedrne DNA na skeletnih ostankih (tipizirali smo zobe, stegnenice in golenice) iz masovnih grobišč druge svetovne vojne smo v našem laboratoriju ugotovili, da so za tipizacijo DNA najprimernejši zobje, tem sledijo stegnenice in slednjim golenice (56). Do podobnih zaključkov sta prišla tudi Miloš s sodelavci in Misner s sodelavci (14, 15).

Prve uspešno izvedene preiskave DNA, pridobljene iz nekaj mesecev do deset let starih kosti, so opravili Lee, Hochmeister in Hagelbergova (53, 57–60). Sledili so jim številni raziskovalci in v odvisnosti od starosti in stopnje poroznosti kosti analizirali jedrne mikrosatelite ali polimorfizme mDNA (14, 34, 37, 61–81). Hagelbergova je pri molekularno antropoloških preiskavah kosti, starih od 300 do 5.500 let, ugotovila, da je ohranjenost DNA v kosteh odvisna predvsem od pogojev, v katerih so se skeletni ostanki nahajali, manj pa od same starosti skeletnih ostankov (59). Lee je iz nekaj mesecev stare kosti brez predhodne dekalcinacije pridobil od 0 do 500 ng DNA/mg kosti, Hochmeister je iz nekaj mesecev do 11 let starih kosti s predhodno dekalcinacijo pridobil od 25 ng do 3,3 µg DNA/g kosti, Yamamoto je iz 16 let starega skeleta novorojenca iz 1 g stegnenice pridobil 5 ng DNA, Seo je iz 10 let starih skeletnih ostankov novorojenca pridobil iz 1,5 g kosti 6 µg DNA, Tahir pa iz 27 let starega ekshumiranega skeleta 8 ng DNA/g kosti (57, 53, 61, 62, 80). V našem laboratoriju smo uspeli pridobiti do 100 ng DNA/g kostnega prahu in kompletne jedrne genetske profile iz 65 let starih kosti, izkopanih iz povojnega množičnega grobišča v kraški jami Konfin I (34, 35).

V Laboratoriju za molekularno genetiko Inštituta za sodno medicino izberemo za genetsko preiskavo za vsak skelet iz posameznega povojnega grobišča eno dolgo kost (najprimernejša je stegnenica) in dva zoba (po možnosti dobro ohranjena in endodontsko nezdravljena kočnika), kar je mogoče le ob izkopu skeletov v anatomski legi. Če izkop skeletov ni bil opravljen v anatomski legi, izberemo za molekularnogenetske preiskave vse

leve ali vse desne stegnenice, najdene v grobišču. Ves skeletni material fotodokumentiramo in primerno označimo ter zamrznemo do postopka izolacije DNA.

UKREPI ZA PREPREČEVANJE KONTAMINACIJE DNA

Kemijski in biološki dejavniki okolja, ki so jim človeški posmrtni ostanki izpostavljeni, povzročajo razgradnjo genetskega materiala in kontaminacijo z DNA bakterij in gliv. Tovrstnih sprememb DNA, ki v največji meri vplivajo na uspešnost tipizacije jedrne ali mDNA, ne moremo preprečiti. Preprečimo pa lahko najnevarnejši tip kontaminacije, to je kontaminacija s človeškim biološkim materialom oz. sodobno DNA. Zaradi nizke vsebnosti DNA in njene razgrajenosti v starih bioloških materialih so tovrstni vzorci zelo dovzetni za kontaminacijo s sodobno DNA. V reakciji PCR sodobna DNA tekmuje z endogeno DNA kosti in zob in končni rezultat tipizacije je v najslabšem primeru genetski profil sodobne – kontaminacijske DNA (55). Do kontaminacije s sodobno DNA lahko pride pri izkopu in shranjevanju skeletov ali med samo tipizacijo v laboratoriju. Najpogostejša je površinska kontaminacija zaradi neprimerne rokovanja (prijemanje skeletnih ostankov brez sterilnih zaščitnih laboratorijskih rokavic). Površinsko kontaminacijo odstranujemo z različnimi metodami. Med njimi so najpogostejše spiranje v vodi, detergentu, kislini, etanolu ali belilu, obsevanje z UV-svetlobo, pri kosteh fizično odstranjevanje površine in kot zadnja, pridobitev DNA iz materiala, odvzetega iz notranjosti kosti ali zoba. Za učinkovito odstranjevanje površinske kontaminacije se običajno uporabljajo različne kombinacije naštetih tehnik.

Uporabo belila (natrijev hipoklorid, NaOCl) kot sredstva za odstranjevanje kontaminacije iz površine starih kosti ali zob je preučeval Kemp (55). Ugotovil je, da belilo uniči kontaminacijsko DNA na površini kosti ali zob, če je pred izolacijskim postopkom vzorec vsaj 15 min obdeloval s 3–6 % belilom. NaOCl z oksidativnim delovanjem razcepi kontaminacijsko DNA na kratke fragmente ali celo posamezne baze, kar sta dokazala Prince in Andrus z neuspelim pomnoževanjem 76 bp

dolgega fragmenta DNA, obdelane z 10 % NaOCl (belilo Clorox) (82). Za endogeno DNA je Kemp ugotovil, da ostane nepoškodovana, tudi če je kost obdeloval s 6 % belilom 21 ur (55). Vzrok za to je izredna stabilnost DNA, ki je v stari kosti verjetno vezana na hidroksiapatit. Ta ščiti DNA pred kemijsko razgradnjo.

Fizično odstranjevanje površine kosti ali izrezovanje materiala iz notranjosti za učinkovito odstranitev površinske kontaminacije po Kempovem prepričanju ni zadostno, saj lahko kontaminacijska DNA prodre globlje v kost (55). Zato je treba ti dve tehniki kombinirati z drugimi tehnikami. Kemp celo priporoča za dekontaminacijo površine le 15-minutno spiranje v 6 % belilu, kar je po njegovem mnenju najučinkovitejše, najhitrejše in cenovno vsem dostopno (55). Belilo je iz kosti ali zob odstranil z večkratnim zaporednim spiranjem (1–2 minuti) z ultračisto, bidestilirano vodo. S to tehniko je učinkovito odstranil površinsko kontaminacijo iz 500–10.000 let starih skeletnih ostankov.

Rennick je preučeval vpliv različnih tehnik za odstranjevanje mehkega tkiva iz površine kosti na razgradnjo endogene DNA (83). Ugotovil je, da štiriurno kuhanje v 3 % raztopini belila povzroča degradacijo endogene DNA, medtem ko kuhanje v vodi ali v vodni raztopini detergenta (Alconox) in natrijevega karbonata (ohranja bazičnost raztopine) na endogeno DNA ne vplivata razgrajevalno. Zato za odstranjevanje mehkega tkiva iz površine kosti namesto belila priporoča uporabo detergenta Alconox.

Pri zobeh je zobna pulpa, ki je glavni vir DNA, zaprta v pulpni votlini in obdana s trdimi tkivi (sklenina, dentin in cement), zato je manj izpostavljena kontaminaciji (49). Večina raziskovalcev uporablja za dekontaminacijo površine zob zaporedno spiranje v detergentu, etanolu in vodi ter obsevanje z UV-svetlobo (39, 48, 52). Če je zob poškodovan (zlomljen ali prizadet z zobno gnilobo), njegovo površino dekontaminiramo le s spiranjem v vodi in obsevanjem z UV-svetlobo (39).

Poleg površinske kontaminacije s sodobno DNA je možna še kontaminacija s predhodnimi produkti reakcije PCR ali kontaminacija reagentov, plastike in druge laboratorijske opreme. Pri molekularnogenetskih preiska-

vah za preprečevanje kontaminacije s sodobno DNA v Laboratoriju za molekularno genetik Inštituta za sodno medicino vedno sledimo mednarodnim priporočilom (4, 22, 29, 30, 55, 64, 65, 84–89). Za zagotavljanje kakovosti in preprečevanje kontaminacije v genetskem laboratoriju upoštevamo veliko ukrepov, med katerimi so najpomembnejši naslednji:

- Da vzorca ne kontaminiramo z lastnim biološkim materialom, pri delu uporabljamo čiste laboratorijske rokavice, ki jih pogosto menjavamo, kirurško masko za nos in usta (prepreči kontaminacijo s slino ob kašljanju, kihanju ali govorjenju), zaščitno kapo in očala ter svež laboratorijski plašč. Pri obdelavi kosti in zob z nizko vsebnostjo DNA uporabljamo dvojne laboratorijske rokavice. Rokavice pri obdelavi različnih vzorcev menjavamo, da ne kontaminiramo vzorcev med seboj.
- Vse laboratorijske površine pred končanim delom in po njem očistimo s komercialno dostopnim razkužilom, vodo in etanolom, pri čemer uporabimo papirnate brisače za enkratno uporabo. Površine očistimo tudi med vzorčenjem in obdelavo različnih skeletnih elementov.
- Uporabljamo vodo in laboratorijsko plastiko, za katero proizvajalec zagotavlja, da je prosta DNA (ne vsebuje DNA).
- Vse orodje za čiščenje, brušenje in mletje kosti in zob pred uporabo umijemo z 10 % detergentom Alconox (Alconox Inc.), sterilno bidestilirano vodo in 80 % etanolom ter ga steriliziramo.
- Vse reagente, orodje in laboratorijsko plastiko po steriliziranju preko noči postavimo pod UV-svetlobo. Dodatno jih obsevamo z UV-svetlobo še vsaj 30 minut pred uporabo.
- Za vsak vzorec kosti ali zob uporabimo čisto in sveže orodje.
- Za vsak vzorec uporabimo sveže sterilne rokavice, ki jih po potrebi med obdelavo posameznega vzorca tudi menjavamo.
- Z rokavicami na rokah se ne dotikamo obraza.
- Vzorce DNA, pridobljene iz kosti ali zob, analiziramo ločeno od referenčnih vzorcev ali vzorcev za eliminacijsko podatkovno zbirko od postopka izolacije DNA pa vse do končnih rezultatov tipizacije.

- Kontaminacijo s predhodnimi produkti reakcije PCR preprečimo s fizično ločitvijo prostorov, kjer kosti in zobe čistimo in meljemo, od tistih, kjer izoliramo genomsko DNA, pripravljamo reakcijske mešanice za PCR in analiziramo produkte pomnoževanja. Po končani reakciji PCR se produkti iz analitskega prostora nikoli ne vračajo v prostor za pripravo kosti in zob, prostor za izolacijo DNA ter prostor za pripravo reakcijskih mešanic za PCR. Postopke pred reakcijo PCR in po njej je treba izvajati v ločenih prostorih.
- Vse reagentne shranjujemo v skladu z navodili proizvajalca.
- Vzoredno z DNA kosti in zob v reakciji PCR pomnožujemo negativno kontrolo, katere pomnožitev nas bi opozorila na kontaminacijo reagentov ali laboratorijske plastike s predhodnimi produkti pomnoževanja ali kontaminacijsko DNA.
- Negativne kontrole vključimo tudi v sam postopek izolacije genske DNA, s čimer preverjamo čistost uporabljene laboratorijske plastike in izolacijskih reagentov.
- Vzoredno z DNA kosti in zob pri mDNA sekvenciramo tudi negativno kontrolo.
- Uporabljamo nastavke za pipete s filtri, ki preprečujejo aerosolno kontaminacijo in so bili pred uporabo vsaj 30 minut izpostavljeni delovanju UV-svetlobe.
- V prostoru, kjer kosti in zobe čistimo in meljemo ter iz njih izoliramo DNA, ne obdelujemo bioloških materialov, ki vsebujejo velike količine DNA (npr. kri, slina), pač pa je ta prostor namenjen izključno delu s starimi kostmi in zobmi.
- Pri kosteh in zobeh izolacije in pomnoževanje ponovimo dvakrat, s čimer preverimo identičnost dobljenih rezultatov.
- mDNA vedno sekvenciramo v obe smeri, s čimer zagotovimo pravilnost določitve nukleotidnega zaporedja.

IZKOP SKELETNIH OSTANKOV IN NJIHOVO SHRANJEVANJE

Stari skeletni ostanki vsebujejo zelo malo DNA ali je ta močno razgrajena. Zato je pravilen pristop k izkopu skeletnih ostankov, antropološki obdelavi in shranjevanju tovrstnega biološkega materiala za uspešnost genetske identifi-

kacije ključnega pomena. Nepravilni postopki pri rokovanju s skeletnimi ostanki in njihovo neprimerno shranjevanje lahko privedejo do kontaminacije in razgradnje endogene DNA kosti in zob, posledica česar so napačni rezultati molekularnogenetskih analiz ali neuspešna analiza (23, 90).

Pri izkopu skeletnih ostankov je z vidika nadaljnjih genetskih preiskav treba upoštevati troje. Obvezna je uporaba čistih rokavic, previdno ravnanje v smislu biološke kontaminacije (ob prehladu, kašljanju ali kihanju je treba nositi masko za usta in nos) in shranjevanje skeletnih ostankov v zračne zaboje. Ni primerna uporaba vreč iz neprodušne umetne mase, saj se v njih kosti ne morejo sušiti in lahko pride do gnitja in razpadanja. Znotraj zaboja naj bodo posamezni anatomske deli skeleta (npr. lobanja z zobmi) dodatno zaščiteni tako, da so shranjeni v čiste papirnate vreče, ki morajo biti ustrezno označene (opremljene z evidenčnimi številkami skeleta, ki mu lobanja pripada). Najprimernejši je navaden papir, ki ni odišavljen in kemično obdelan. Skeletne ostanke je treba ustrezno dokumentirati (označiti in fotografirati) in shranjevati v čistih, zračnih in suhih prostorih, kjer so za razvoj mikroorganizmov slabši pogoji (91).

Za antropološko obdelavo skeletnih ostankov je najprimerneje antropologa oskrbeti z razkužilnimi sredstvi, laboratorijskimi rokavicami, kapami, maskami in plašči za enkratno uporabo ter ga seznaniti s pravilnim načinom rokovanja s skeletnimi ostanki (uporaba zaščitnih oblačil, razkuževanje delovne površine in inštrumentov ter menjavanje rokavic).

ELIMINACIJSKA PODATKOVNA ZBIRKA

Do kontaminacije posmrtnih ostankov s človeškim biološkim materialom oziroma sodobno DNA lahko pride, kot smo že omenili, ob izkopu, ob neprimernem shranjevanju skeletnih ostankov ter ob antropoloških in molekularnogenetskih preiskavah (28). V genetskem laboratoriju se lahko kontaminacijska DNA nahaja v laboratorijski plastiki, reagentih ali so fragmenti DNA vezani na aerosolne delce v zraku (92). Da lahko omogočimo sledljivost v primeru pojava kontaminacije, moramo

za posamezno grobišče pripraviti eliminacijsko podatkovno zbirko, ki vsebuje vse osebe, ki v katerikoli fazi zbiranja, shranjevanja, antropološke in molekularnogenetske preiskave pridejo v stik s skeletnimi ostanki. Treba je pridobiti brise ustnih sluznic vseh, ki so sodelovali pri izkopu, vseh, ki so sodelovali pri antropološki študiji, in vseh, ki sodelujejo pri molekularnogenetski identifikaciji. Osebam, ki sestavljajo eliminacijsko podatkovno zbirko, je treba dostaviti komplete za odvzem brisa ustne sluznice na sterilno vatirano palčko z navodili za pravilen odvzem. Poleg brisov ustne sluznice je treba pridobiti tudi podpisano izjavo o strinjanju s preiskavo. Za vse osebe, ki so vključene v eliminacijsko podatkovno zbirko, je treba pridobiti genetske profile jedrne avtosomske DNA, mDNA in za osebe moškega spola še haplotipe kromosoma Y (33–37).

REFERENČNE OSEBE – SORODNIKI ŽRTEV

Za zbiranje referenčnih oseb – še živečih sorodnikov je treba v medijih objaviti seznam domnevnih žrtev grobišča in telefonsko številko tajništva Inštituta za sodno medicino, kjer lahko svoji pridobijo vse potrebne informacije o nadaljnjem postopku zbiranja brisov ustne sluznice. Po pogovoru s svojci in izbiri primernih referenčnih oseb sorodnikom po pošti pošljemo komplet za odvzem brisa ustne sluznice, ki vsebuje sterilno, zaščiteno vatirano paličico in navodila za pravilen odvzem brisa ustne sluznice ter sterilne rokavice. Prav tako sorodniki prejmejo v podpis izjavo, da se strinjajo s preiskavo in z objavo rezultatov genetske identifikacije. Svojci nam po pošti vrnejo brise ustnih sluznic in podpisane izjave. Za primerjavo avtosomskih mikrosatelitov jedrne DNA kot referenčne osebe uporabimo najbližje sorodnike žrtev, za primerjavo polimorfizmov mDNA uporabimo sorodnike po materini liniji, ki so lahko v bližnjem ali daljnem sorodu z žrtvijo, za primerjavo haplotipov kromosoma Y pa uporabimo bližnje ali daljne sorodnike po očetovi liniji. Za vse sorodnike pridobimo genetske profile za avtosomsko jedrno DNA, profile kromosoma Y pridobimo za sorodnike po očetovi liniji, profile mDNA pa za sorodnike po materini liniji.

Molekularnogenetsko identifikacijo žrtev povojnih množičnih grobišč sestavlja več korakov. Prvi je pridobitev DNA iz skeletnih ostankov ter iz sline sorodnikov žrtev in oseb, ki sestavljajo eliminacijsko podatkovno zbirko. Temu sledi določitev količine DNA v vzorcih ter pridobitev genetskih profilov avtosomske jedrne DNA, haplotipov kromosoma Y in mDNA za kosti in zobe, referenčne osebe in osebe iz eliminacijske podatkovne zbirke. Preveriti je treba čistost ekstrakcijskih in pomnoževalnih negativnih kontrol. Pridobljene genetske profile kosti in zob primerjamo z genetskimi profili oseb iz eliminacijske podatkovne zbirke nato pa še z genetskimi profili referenčnih oseb – še živečih sorodnikov žrtev. V končni fazi ob ujemanju profilov kosti in zob žrtev grobišč z referenčnimi osebami statistično ovrednotimo verjetnost sorodstvenih povezav.

PRIDOBITEV (IZOLACIJA ALI EKSTRAKCIJA) GENOMSKE DNA

Metoda izolacije DNA iz kosti je ena najzahtevnejših in najdaljših izolacijskih metod v forenzičnih genetskih preiskavah. Ker je v starih kosteh prisotnih veliko inhibitorjev reakcije PCR (predvsem huminske kisline iz zemlje) in je vsebnost DNA nizka, je treba izbrati takšno izolacijsko metodo, ki omogoča pridobitev čim večje količine DNA in odstranitev inhibitornih snovi v čim večji meri (93). Dekalcinacija z 0,5 M etilendiaminetetraoacetno kislino (angl. *ethylenediaminetetraoetic acid*, EDTA) nam omogoča ločitev kostnih celic od medceličnine (79). Pri svežih kosteh in zobeh za pridobitev genomske DNA ni potrebna predhodna dekalcinacija, pri starih skeletnih ostankih pa nam predhodna dekalcinacija omogoča pridobitev večje količine DNA (53). Tako je Loreillu s sodelavci uspelo s popolno demineralizacijo kosti pridobiti zadostne količine DNA iz starih skeletnih ostankov, ki brez demineralizacije niso dali nobenih rezultatov (94). Več raziskav je pokazalo, da umivanje skeletnih ostankov in rokovanje z njimi brez zaščite kontaminira površino in do določene mere tudi notranjost kosti in zob s sodobno DNA, pri čemer je kontaminacija notranjosti odvisna od ohranjenosti in stopnje poroznosti skeletnih ostankov (95–97).

Zato je treba skeletizirane posmrtnne ostanke očistiti mehansko in kemično, obsevati z UV-svetlobo in upoštevati vse ukrepe za zagotavljanje kakovosti in preprečevanje kontaminacije, ki smo jih našteali v poglavju Ukrepi za preprečevanje kontaminacije DNA. Postopek izolacije genomske DNA vključuje tri korake: čiščenje, mletje in ekstrakcijo DNA iz kostnega in zobnega prahu (98).

Čiščenje kosti in zob

Površinsko kontaminacijo pri kosteh in zobeh odstranimo s kombinacijo naslednjih tehnik: fizično odstranjevanje površine (pri zobeh ta postopek zamenjamo z obsevanjem z UV-svetlobo) ter spiranje v detergentu, vodi in etanolu. Od stegenice (enako velja za druge dolge kosti) z žago, ki ji vstavimo nov sterilni list, odrežemo približno 10 cm dolg kos kompaktne kosti in ga vzdolžno prerežemo. S površine vzdolžno prerezanega dela kosti in iz zoba s skalpelom odstranimo zemljo. Nato kost in zob spiramo v sterilni bidestilirani vodi ter ju preko noči posušimo. Sledi tehtanje in odstranjevanje površinske kontaminacije pri kosteh z brušenjem in pri zobeh z obsevanjem z UV-svetlobo na obeh straneh po 30–60 minut. Kost vpnemo v primež (Proxxon) in z linearnim brušenjem s pomočjo brusilnika (Minicraft MB 8571) in različnih brusilnih nastavkov (Proxxon) odstranimo površinsko plast, debelo 2–3 mm. Da pri brušenju ne pride do pregrevanja kosti, jo večkrat ohladimo s tekočim dušikom. Segrevanje kosti lahko namreč povzroči razgradnjo endogene DNA (64). Očiščen del kosti, katerega teža običajno ne presega 4–6 g (teža zob je manjša), s krožno diamantno žagico (Proxxon) odrežemo od preostalega dela kosti. Sledi kemično čiščenje kosti in zob s 5 % detergentom Alconox (Alconox Inc.), sterilno vodo in 80 % etanolom.

Mletje kosti in zob

Za ekstrakcijo zadostne količine DNA iz starih skeletnih ostankov je treba iz kosti in zob pridobiti fin prah, za kar ni primeren vsak homogenizator. Pri zelo malih delcih prahu je demineralizacija učinkovitejša in hitrejša (99). Kostni in zobni prah pridobimo ob uporabi tekočega dušika z mletjem v homo-

genizatorju TissueLyser (Retsch), pri čemer uporabimo kovinske komore s kovinskimi krogli. S tekočim dušikom ohladimo tako kovinske komore kot očiščene fragmente kosti in zobe ter jih meljemo 1–2 minuti pri frekvenci 30 Hz. Dobljeni prah prenesemo v epruveto, stehamo in zamrznemo do postopka ekstrakcije genomske DNA.

Ekstrakcija DNA

Genomsko DNA ekstrahiramo iz 0,5 g kostnega ali zobnega prahu po 72-urni dekalcinaciji v raztopini 0,5 M EDTA. Vzorcju dodamo proteinazo K in inkubiramo preko noči pri 56 °C. Po centrifugiranju iz supernatanta ob uporabi kompleta EZ1 DNA Investigator Kit in istoimenske raziskovalne kartice (Qiagen) izoliramo genomsko DNA v napravi Biorobot EZ1 (Qiagen). Celoten postopek ekstrakcije je avtomatiziran, traja le 20 minut in ne zahteva uporabe nevarnih organskih topil, kot sta fenol in kloroform. Temelji na tehnologiji magnetnih delcev, pri kateri se nukleinske kisline vežejo na s silicijem prevlečene površine magnetnih delcev v prisotnosti kaotropičnih soli (gvanidin tiocianat – GuSCN ali gvanidin hidroklorid – GuHCl ali natrijev jodid – NaI), ki so izredno učinkovite pri čiščenju nukleinskih kislin (100). Kaotropične soli namreč lizirajo celice, denaturirajo proteine, inaktivirajo nukleaze ter pospešujejo vezavo DNA na paramagnetne, s silicijem prevlečene delce. Celoten ekstrakcijski postopek poteka v plastičnem nastavku za pipete, ki je zavarovan s filtrom in ga po uporabi zavržemo. Tudi izolacijski reagenti so v zaprtem sistemu, jih ni treba ročno pipetirati in so za enkratno uporabo, kar močno zmanjša možnost kontaminacije. Pri skeletnih ostankih z nizko vsebnostjo DNA je slednje izrednega pomena. Veliko učinkovitost ekstrakcije DNA s tehnologijo magnetnih delcev so potrdile številne študije (101–104). V ekstrakcijskem postopku pridobljeno DNA kosti in zob zamrznemo do postopka kvantifikacije in tipizacije jedrne in mDNA. V postopek ekstrakcije genomske DNA vključimo negativne kontrole, s čimer preverjamo čistost izolacijskih reagentov in plastike. Iz sline sorodnikov in oseb za eliminacijsko podatkovno zbirko pridobimo genomsko DNA v napravi Biorobot EZ1 (Qiagen) ob uporabi kompleta EZ1 DNA

Investigator Kit in istoimenske raziskovalne kartice (Qiagen).

KVANTIFIKACIJA ALI DOLOČITEV KONCENTRACIJE DNA V VZORCU

Kadar preiskujemo močno poškodovano (razgrajeno) DNA ali ko je število kopij molekul DNA v vzorcu zelo nizko, je treba pred pomnoževanjem v reakciji PCR vzorce kvantificirati, saj lahko le s tem zagotovimo kakovost preiskav, ki temeljijo na metodi PCR. Ob uporabi zelo nizke koncentracije začetne DNA (pod 20 kopij (60 pg) pri jedrni DNA) se namreč zaradi stohastičnega učinka možnost napak pri pomnoževanju v reakciji PCR poveča zaradi nepomnoženih alelov (105). Za kvantifikacijo DNA je na razpolago veliko različnih metod; najnovejša temelji na kvantitativni reakciji PCR v realnem času (angl. *real-time PCR*) in ima od vseh znanih kvantifikacijskih metod največjo občutljivost (105–107). Kvantifikacija jedrne in mDNA nam služi kot začetni presejalni test, saj lahko na osnovi rezultatov kvantifikacije ocenimo, ali je vzorec kosti ali zob primeren za tipizacijo mikrosatelitov jedrne DNA ali le za tipizacijo mDNA. Določimo lahko optimalno količino DNA za uspešno analizo, s čimer zmanjšamo porabo DNA in ohranimo vzorec za nadaljnje neodvisne preiskave (108). Kvantifikacijski testi nam omogočajo tudi zaznavo inhibitornih snovi v vzorcu (107).

Vsak vzorec DNA (pridobljen iz kosti, zob, slin sorodnikov in oseb za eliminacijsko podatkovno zbirko) pred pomnoževanjem v reakciji PCR kvantificiramo z metodo kvantitativne reakcije PCR v realnem času. Metoda temelji na zaznavi 5'-nukleazne aktivnosti Taq DNA-polimeraze ob uporabi s fluorescentnimi barvili označenih sond in detekcijskega sistema, pri katerem spremljamo napredovanje pomnoževanja s PCR v realnem času. Računalniški program v povezavi s standardno krivuljo avtomatsko izračuna koncentracijo DNA v preiskovanem vzorcu. Za kvantifikacijo jedrne DNA uporabimo komplet Quantifiler Human DNA Quantification kit (Applied Biosystems), s katerim pomnožujemo 62 bp dolg intronski odsek gena *TERT* (gen za telomerazno reverzno transkriptazo),

ki se nahaja na kromosomu 5. Z notranjo pozitivno kontrolo, ki je dodana vsakemu vzorcu, ugotavljamo prisotnost inhibitornih snovi v vzorcu DNA. Z uporabo tega kompleta lahko natančno določimo količino DNA v preiskovanem vzorcu v območju od 23 pg/μl do 50 ng/μl.

V našem laboratoriju smo uspeli pridobiti do 100 ng DNA/g kostnega prahu iz 84 stegnic, izkopanih iz povojnega množičnega grobišča v kraškem breznu Konfin I, do 8,6 ng DNA/g kostnega prahu iz treh stegnic grobišča pod Storžičem, do 55 ng DNA/g zobnega prahu iz dveh kočnikov skeleta iz grobišča pod Storžičem in do 16 ng DNA/g kostnega prahu iz 25 stegnic, izkopanih iz grobišča Bodovelske grapa (23, 34, 35, 37). Jdrne DNA nismo zaznali pri izolacijskih negativnih kontrolah, kar kaže na čistost postopka izolacije in odsotnost kontaminacije vzorcev med postopkom izolacije.

GENETSKI PROFILI AVTOSOMSKE JEDRNE DNA, HAPLOTIPI KROMOSOMA Y IN HAPLOTIPI MITOHONDRIJSKE DNA

Za hkratno pomnoževanje avtosomskih mikrosatelitov je običajno potrebno 250 pg DNA (50 dvoverižnih kopij) in 28–30 ciklov reakcije PCR, vendar z novimi pomnoževalnimi kompleti pridobimo popolne genetske profile tudi iz manj kot 100 pg DNA (56).

Neuspešno pomnoževanje jedrnih avtosomskih mikrosatelitov je lahko posledica:

- preveč razgrajene DNA (treba bi bilo uporabiti začetne oligonukleotide, ki dajejo krajše produkte pomnoževanja),
- zelo nizkih koncentracij DNA (uporabiti bi bilo treba večje število ciklov reakcije PCR),
- inhibicije reakcije PCR zaradi prisotnosti inhibitornih snovi (DNA bi bilo treba redčiti z vodo v volumskem razmerju vsaj 1:20, v reakcijo PCR bi bilo treba vključiti goveji serumski albumin (angl. *bovine serum albumin*, BSA) in povečati količino polimeraze) ali
- prisotnosti polimorfizma (mutacije) v nukleotidnem zaporedju, kamor bi se morali vezati začetni oligonukleotidi.

Pri prvih treh točkah je vzrok neuspešnega pomnoževanja pojav prioriteta enega alela, pri zadnji točki pa pojav tihih alelov zaradi mutacije.

Pri molekularnogenetski preiskavi kosti in zob žrtev iz grobišč je treba opraviti tipizacijo jedrne avtosomske DNA, mikrosatelitov na kromosomu Y, treba pa je določiti tudi nukleotidno zaporedje regij HVI in HVII mDNA. Jedrno avtosomsko DNA tipiziramo s tremi komercialno dostopnimi kompleti. Profile, dobljene s kompletom AmpF/STR NGM® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems), preverimo še s kompletom Investigator ESSplex Kit (Qiagen) in s kompletom MiniFiler (Applied Biosystems), ki nam omogoča pomnoževanje kratkih mikrosatelitov pri močno razgrajeni DNA. Tipizacijo mikrosatelitov na kromosomu Y izvedemo z zaporednima pomnožitvama s kompletom YFiler (Applied Biosystems), s sekvenciranjem pa določimo nukleotidno zaporedje regij HVI in HVII mDNA (109).

Pri referenčnih osebah – še živečih sorodnikih opravimo tipizacijo jedrne avtosomske DNA s kompletom AmpF/STR NGM® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems). Za sorodnike po materini liniji je treba določiti nukleotidno zaporedje regij HVI in HVII mDNA, za sorodnike po očetovi liniji pa opraviti tipizacijo mikrosatelitov na kromosomu Y, za kar uporabimo komplet YFiler (Applied Biosystems).

Pri osebah za eliminacijsko podatkovno zbirko opravimo tipizacijo jedrne avtosomske DNA s kompletom AmpF/STR NGM® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems), določimo nukleotidno zaporedje regij HVI in HVII mDNA, pri moških osebah pa opravimo še tipizacijo mikrosatelitov na kromosomu Y, za kar uporabimo komplet YFiler (Applied Biosystems).

Pridobitev genetskih profilov avtosomske jedrne DNA

S pomnoževalnim kompletom AmpF/STR NGM® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) sočasno pomnožimo 15 avtosomskih mikrosatelitov (D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, D10S1248, D1S1656, D2S1338, D16S539, D22S1045, vWA, D8S1179, FGA, D2S441, D12S391, D19S433) in odsek ame-

logenijskega homolognega gena X in Y, ki nam omogoča določitev spola. Za ta komplet je optimalna količina začetne genomske DNA 0,5 ng. Vzporedno z vzorci kosti in zob iz grobišč pomnožimo negativno kontrolo.

S kompletom Investigator ESSplex Kit (Qiagen) sočasno pomnožimo 15 avtosomskih mikrosatelitov (D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, D10S1248, D1S1656, D2S1338, D16S539, D22S1045, vWA, D8S1179, FGA, D2S441, D12S391, D19S433) in odsek amelogeninskega gena. Za ta komplet je optimalna količina začetne genomske DNA 0,35 ng. Vzporedno z vzorci kosti in zob iz grobišč pomnožimo negativno kontrolo.

S kompletom MiniFiler (Applied Biosystems) sočasno pomnožimo 8 avtosomskih mikrosatelitov (D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1PO in FGA) in odsek amelogeninskega gena. Za ta komplet je optimalna količina začetne genomske DNA 0,5–0,75 ng. Vzporedno z vzorci kosti in zob iz grobišč pomnožimo negativno kontrolo.

Fluorescentno označene produkte naštetih kompletov, ki se med seboj razlikujejo po dolžini in po barvi, ločimo 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 550 BTO (Qiagen). Genetske profile določimo z računalniškim programom Data Collection v 3.0 in GeneMapper ID v 3.2 (Applied Biosystems).

Genetske profile grafično prikažemo z elektroferogrami, na katerih vsak vrh ustrezno enemu alelu mikrosatelita. 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 (angl. *relative fluorescence units*, RFU). Pri kompletu AmpF/STR NGM (Applied Biosystems) so z modro barvo označeni štirje mikrosateliti (od najkrajšega do najdaljšega si sledijo po velikosti v naslednjem vrstnem redu: D10S1248, vWA, D16S539 in D2S1338), z zeleno trije mikrosateliti (D8S1179, D21S11 in D18S51) ter odsek amelogeninskega gena, homolognega kromosomoma X in Y, ki nam omogoča določitev spola. S črno barvo so označeni štirje

mikrosateliti (D22S1045, D19S433, THO1 in FGA) in z rdečo barvo štirje mikrosateliti (D2S441, D3S1358, D1S1656 in D12S391). Pri kompletu Investigator ESSplex (Qiagen) so z modro barvo označeni štirje mikrosateliti (od najkrajšega do najdaljšega si sledijo po velikosti v naslednjem vrstnem redu: THO1, D3S1358, vWA in D21S11) ter odsek amelogenskega gena, z zeleno pet mikrosatelitov (D16S539, D1S1656, D19S433, D8S1179 in D2S1338). S črno barvo so označeni štirje mikrosateliti (D10S1248, D22S1045, D12S391 in FGA) in z rdečo barvo dva mikrosatelita (D2S441 in D18S51). Pri kompletu MiniFiler (Applied Biosystems) sta z modro barvo označena dva mikrosatelita (D13S317 in D7S820), z zeleno prav tako dva mikrosatelita (D2S1338 in D21S11) ter odsek amelogenskega gena, s črno barvo dva mikrosatelita (D16S539 in D18S51) in z rdečo barvo zadnja dva mikrosatelita (CSF1PO in FGA).

Na sliki 1 sta prikazana elektroferograma genetskih profilov skeleta (zoba) iz poveljnega grobišča Storžič, ki smo ju pridobili s kompletoma AmpFISTR NGM® (Applied Biosystems) in Investigator ESSplex Kit (Qiagen).

Pri molekularnogenetskih identifikacijah žrtev poveljnih pobojev smo uspeli pridobiti avtosomske jedrne genetske profile iz kar 98% stegenic, izkopenih iz grobišča v kraškem breznu Konfin I, iz vseh treh skeletov grobišča

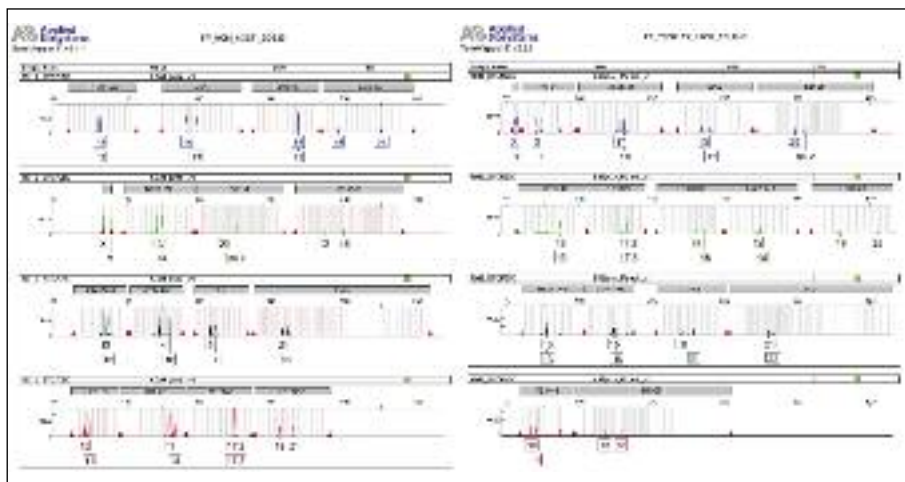
pod Storžičem ter iz 18 od skupno 25 kosti, ki smo jih tipizirali za grobišče Bodoveljska grapa (23, 34, 35, 37).

Pridobitev haplotipov kromosoma Y

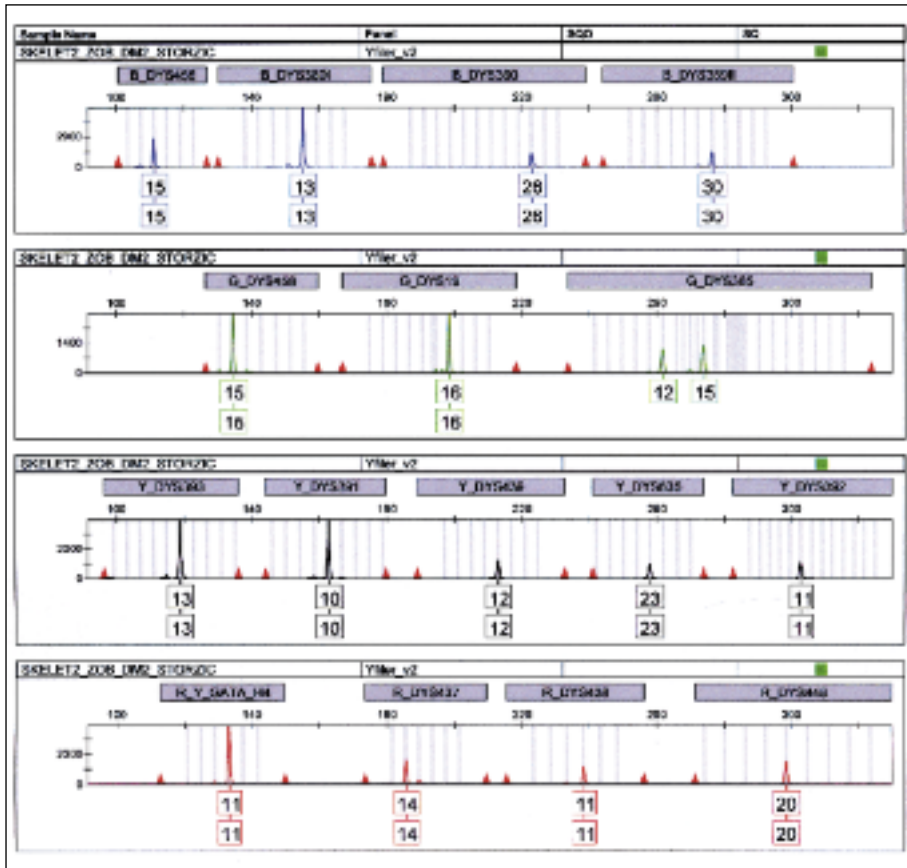
S kompletom Yfiler (Applied Biosystems) sočasno pomnožimo 17 mikrosatelitov kromosoma Y: DYS456, DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19, DYS385 a/b, DYS393, DYS391, DYS439, DYS635, DYS392, Y GATA H4, DYS437, DYS438 in DYS448. Za ta komplet je optimalna količina začetne genomske DNA 0,5–1 ng. Vzporedno z vzorci kosti in zob iz grobišč pomnožimo negativno kontrolo.

Fluorescentno označene produkte reakcije Yfiler ločimo 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). Genetske profile določimo s pomočjo računalniških programov Data Collection v 3.0 in GeneMapper ID v 3.2 (Applied Biosystems).

Genetske profile grafično prikažemo z elektroferogrami, na katerih vsak vrh ustreza alelu mikrosatelita. Os x nam podaja dolžino fragmentov DNA (aleli so označeni s številom ponovitev osnovnih motivov), os y pa intenziteto fluorescentnega signala v (RFU).



Slika 1. Elektroferograma popolnih genetskih profilov avtosomskih mikrosatelitov skeleta (zoba) iz poveljnega grobišča Storžič, ki smo ju pridobili s kompletoma AmpFISTR NGM® (Applied Biosystems) in Investigator ESSplex Kit (Qiagen).



Slika 2. Elektroferogram popolnega genetskega profila mikrosatelitov kromosoma Y skeleta (zoba) iz povojnega grobišča Storžič, ki smo ga pridobili s kompletom YFiler (Applied Biosystems).

Pri kompletu YFiler (Applied Biosystems) so z modro barvo označeni štirje mikrosateliti (od najkrajšega do najdaljšega si sledijo po velikosti v naslednjem vrstnem redu: (DYS456, DYS389I, DYS390 in DYS389II), z zeleno štirje mikrosateliti, (DYS458, DYS19, DYS385a in DYS385b), s črno pet mikrosatelitov (DYS393, DYS391, DYS439, DYS635 in DYS392) in z rdečo barvo štirje mikrosateliti (Y GATA H4, DYS437, DYS438 in DYS448).

Rezultati tipizacije mikrosatelitov kompleta YFiler so prikazani na sliki 2 (pomnožili smo DNA, pridobljeno iz skeleta (zoba) iz grobišča Storžič).

Pri molekularnogenetskih identifikacijah žrtev povojnih pobojev smo uspeli pridobiti haplotipe kromosoma Y iz kar 98 % stegenic, izkopanih iz grobišča v kraškem breznu

Konfin I in iz vseh treh skeletov grobišča pod Storžičem (34, 35, 37).

Pridobitev haplotipov mitohondrijske DNA

Za določitev haplotipa mDNA v reakciji PCR pomnožimo celotno regijo HVI in HVII; HVI z začetnima oligonukleotidoma L15997/H16401, HVII pa z L00029/H00408 (109, 110). Vzoredno z vzorci kosti in zob iz grobišč pomnožimo negativno kontrolo. Pomnožitvene produkte prečistimo z ultrafiltracijskimi enotami Centricon-100 (Millipore Corporation) in sekvenciramo z metodo avtomatskega neposrednega fluorescentnega sekvenciranja ob uporabi kompleta BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, verzi-

ja 1.1 (Applied Biosystems). Regiji HVI in HVII v skladu z mednarodnimi priporočili vedno sekvenciramo v obeh smereh in tako s sekvenciranjem težke verige preverimo nukleotidno zaporedje, dobljeno s sekvenciranjem lahke verige mDNA (22). Produkte sekvenčne reakcije prečistimo s kolonami MicroSpin® G-50 (Amersham Biosciences) in jih ločimo 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 AB DNA Sequencing Analysis Software v 5.2 (Applied Biosystems). Pridobljena nukleotidna zaporedja primerjamo v regiji HVI v območju 16030–16381, v regiji HVII pa v območju 55–388 z Andersonovo referenčno sekvenco, ki jo uporabljamo kot referenčno nukleotidno zaporedje pri raziskovanju polimorfizmov človeške mDNA (111).

Rezultate tipizacije mDNA prikazujemo v obliki elektroferogramov, pri katerih vsak vrh ustreza eni bazi, baze pa se razlikujejo med seboj po barvi. Z modro barvo je označen citozin (C), z zeleno adenin (A), s črno gvanin (G) in z rdečo timin (T).

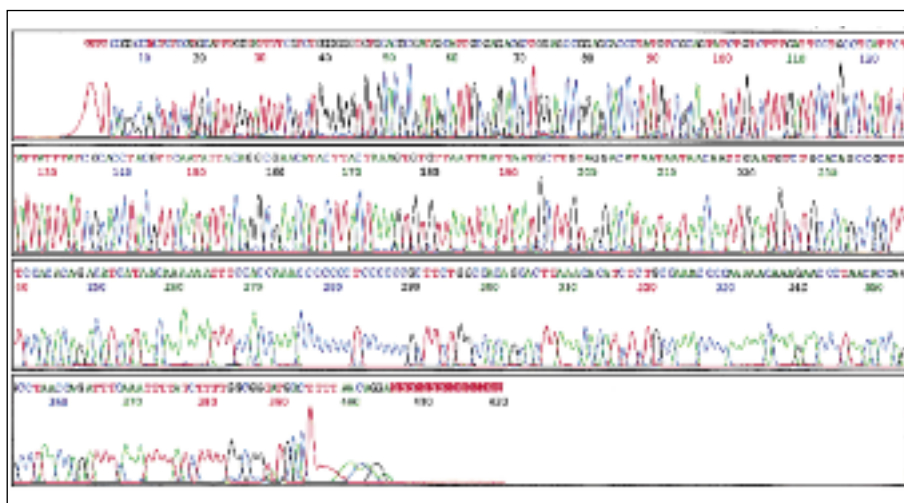
Na sliki 3 je prikazan elektroferogram nukleotidnega zaporedja celotne hipervariabilne regije HVII lahke verige mDNA skele-

ta (zoba) iz grobišča Storžič, ki smo ga pridobili z metodo avtomatskega neposrednega fluorescentnega sekvenciranja.

Pri molekularnogenetskih identifikacijah žrtev povojnih pobojev smo uspeli pridobiti haplotipe mDNA iz kar 98 % stegnic, izkopanih iz grobišča v kraškem breznu Konfin I, iz vseh treh skeletov grobišča pod Storžičem ter iz vseh 25 skeletov, ki smo jih tipizirali pri grobišču Bodoveljska grapa (23, 34, 35, 37).

STATISTIČNI IZRAČUN VERJETNOSTI SORODSTVENIH POVEZAV

Dobljene genetske profile (avtosomske, haplotipe kromosoma Y in mDNA) kosti oziroma zob in referenčnih oseb med seboj primerjamo in ugotavljamo, ali imajo skupen izvor ali ne. Kadar se dva profila med seboj ne ujema, biološka vzorca nimata skupnega izvora. Ob ujemanju genetskih profilov potrdimo skupen izvor in statistično ovrednotimo moč genetskega dokaza. Verjetnosti sorodstvenih povezav za avtosomske mikrosatelite izračunamo s statističnim programom DNA VIEW v. 28.71 (2011) avtorja C. H. Brennerja (Berkeley, ZDA), pri čemer upoštevamo alelne



Slika 3. Sekvenca celotne hipervariabilne regije HVII lahke verige mDNA skeleta (zoba) iz grobišča Storžič, dobljena z metodo avtomatskega neposrednega fluorescentnega sekvenciranja ob uporabi kompleta BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems).

frekvence v slovenski populaciji in predhodno verjetnost $1/n+1$, pri čemer predstavlja n število žrtev v grobišču (112–115). Verjetnosti sorodstvenih povezav za haplotipe kromosoma Y in za haplotipe mDNA pa izračunamo na osnovi frekvenc haplotipov (P) v različnih podatkovnih zbirkah (116). Frekvenco haplotipa kromosoma Y določimo s pomočjo podatkovne zbirke YHRD (angl. *Y chromosome haplotype reference database*), frekvenco haplotipa mDNA pa s podatkovno zbirko EMPOP (angl. *European mDNA Database*), pri čemer za oceno frekvence haplotipa uporabimo metodo štetja ter upoštevamo korekcijski faktor za napake pri vzorčenju (85, 117–120). Korekcija je potrebna zaradi razmeroma majhnih podatkovnih zbirk in velikega števila haplotipov, zaradi česar pogosto opazimo nov haplotip, ki ga v obstoječi podatkovni zbirki ni:

$$P = \chi + 2 / n + 2, \quad (1)$$

pri čemer je P frekvence haplotipov, χ število opaženih haplotipov v podatkovni zbirki, n pa število oseb s tem haplotipom (22, 120).

Verjetnosti sorodstvenih povezav podamo v obliki verjetnostnega razmerja, ki ga označimo s kratico LR (angl. *likelihood ratio*). Poleg LR podamo tudi vrednost za naknadno verjetnost sorodstva, ki jo označimo s kratico PP (angl. *posterior probability*) in upošteva predhodno verjetnost dogodka. Za predhodno verjetnost upoštevamo število žrtev v grobišču, kot pozitivno identificirane žrtve pa upoštevamo tiste žrtve, pri katerih dosegamo naknadno verjetnost 99,9% (115, 121, 122). Pri avtosomskih mikrosatelitih nam LR pove, kolikokrat bolj verjetno je, da izkopane kosti ali zobje pripadajo osebi, ki je v sorodu z referenčno osebo, kot da pripadajo neki naključno izbrani z referenčnim vzorcem nesorodni osebi iz slovenske populacije. Ob identičnem haplotipu mDNA kosti ali zob in referenčne osebe nam LR pove, kolikokrat bolj verjetno je, da pripadajo izkopane kosti in zobje ter referenčna oseba isti maternalni liniji, kot da pripadajo različnima maternalnima linijama. Ob identičnem haplotipu kromosoma Y pa nam LR pove, kolikokrat bolj verjetno je, da pripadajo izkopane kosti in zobje ter referenčna oseba isti paternalni liniji, kot da pripadajo različnima paternalnima linijama.

Kromosom Y in mDNA nam ob preiskavi avtosomske jedrne DNA služita kot zelo koristna dodatna sistema pri identifikaciji žrtev množičnih pobojev ob koncu druge svetovne vojne v Sloveniji, saj lahko v preiskavo vključimo tudi daljne sorodnike po očetu in materini liniji, hkrati pa lahko s pomočjo kromosoma Y in mDNA pri bližnjih sorodnikih, npr. bratih in sestrah, povečamo izračunano statistično verjetnost sorodstva med žrtvijo in še živim sorodnikom (120, 123). Kadar opazimo med kostmi (ali zobmi) in sorodniki ujemanje avtosomskih jedrnih genetskih profilov in haplotipov mDNA, uporabimo pri oceni skupnega verjetnostnega razmerja (LRc) pravilo produkta (123). Enako naredimo, kadar opazimo ujemanje avtosomskih jedrnih genetskih profilov in haplotipov kromosoma Y (120).

Za avtosomske mikrosatelite jedrne DNA in genetske označevalce mDNA velja, da se dedujejo neodvisno. Z vidika matematične verjetnostne teorije torej predstavljata jedrni profil in haplotip mDNA osebe dva neodvisna dogodka, zato lahko pri oceni skupnega verjetnostnega razmerja (LRc) uporabimo pravilo produkta in ga izračunamo po enačbi:

$$LRc = LR_{(avtosomski\ STR)} \times LR_{(mDNA)} \quad (123). \quad (2)$$

Prav tako se dedujejo neodvisno avtosomski mikrosateliti in mikrosateliti kromosoma Y, zato lahko tudi pri teh genetskih označevalcih uporabimo pravilo produkta in skupno verjetnostno razmerje izračunamo po enačbi:

$$LRc = LR_{(avtosomski\ STR)} \times LR_{(Y-STR)} \quad (120). \quad (3)$$

Dobljene genetske profile (avtosomske, kromosoma Y in mDNA) kosti in zob primerjamo tudi s profili oseb iz eliminacijske podatkovne zbirke, s čimer ugotavljamo, ali je prišlo do kontaminacije vzorcev kosti in zob s sodobno DNA.

PRIMER POZITIVNE IDENTIFIKACIJE ŽRTVE POVOJNEGA MNOŽIČNEGA GROBIŠČA

Pozitivno molekularnogenetsko identifikacijo žrtev povojnih množičnih grobišč prikazujemo na primeru ene od žrtev poboja v kraškem breznu Konfin I. Žrtev JG smo identificirali

s primerjavo s še živečo sestro AK, ki nam je služila za primerjavo jedrnih avtosomskih mikrosatelitskih polimorfizmov in haplotipov mDNA. Desna stegnenica 43 pat (oznaka pat označuje patologijo kosti – zlom) in desna stegnenica 48 pat imata identične genetske profile avtosomske jedrne DNA, kromosoma Y in mDNA, kar kaže na to, da obe kosti pripadata isti osebi iz grobišča. Desni stegnenici 43 in 48 pat sta prelomljeni, fragmentirani kosti. Na sliki 4 je prikazana desna stegnenica 43 pat in fragment, ki smo ga odvzeli za genetsko preiskavo. Na sliki 5 pa je prikazana desna stegnenica 48 pat in fragment, ki smo ga odvzeli za genetsko preiskavo.

Desni stegnenici 43 in 48 pat imata identičen haplotip mDNA kot sorodnica AK (glej tabelo 1). Haplotip mDNA desnih stegnenic 43 in 48 pat ter sestre AK smo v evropski kavkazijski podatkovni zbirki, ki vsebuje 4.476 haplotipov, opazili enkrat. Vrednost za LR za ta haplotip je 1.493, kar pomeni, da je 1.493-krat

bolj verjetna hipoteza, da pripadata desni stegnenici 43 in 48 pat in AK isti maternalni liniji, kot hipoteza, da pripadata različnim maternalnim linijam. V tabeli 2 so prikazani genetski profili jedrne avtosomske DNA desnih stegnenic 43 in 48 pat ter sestre AK.

Za analizirane mikrosatelite smo izračunali LR, katerega vrednost je 681 (to pomeni, da je 681-krat bolj verjetno, da fragmenta desnih stegnenic 43 in 48 pat pripadata bratu AK, kot da pripadata neki naključno izbrani, AK nesorodni osebi iz slovenske populacije). Naknadna verjetnost sorodstva (PP) je 87,3 %, pri čemer smo upoštevali kot predhodno verjetnost sorodstva vrednost 0,01. JG smo identificirali s polimorfizmi jedrne avtosomske DNA in mDNA, zato smo izračunali skupno verjetnostno razmerje LRC, katerega vrednost je 1×10^6 . Naknadna verjetnost sorodstva (PP) je 99,99 %, pri čemer smo upoštevali kot predhodno verjetnost sorodstva vrednost 0,01. V tabeli 3 sta prikazana haplo-



Slika 4. Desna stegnenica 43 pat iz grobišča Konfin I in fragment, odvzet za genetsko preiskavo (oznaka pat označuje patologijo kosti – zlom).



Slika 5. Desna stegnenica 48 pat iz grobišča Konfin I in fragment, odvzet za genetsko preiskavo (oznaka pat označuje patologijo kosti – zlom).

tipa kromosoma Y desnih stegnic 43 in 48 pat. Obe kosti imata identičen haplotip kromosoma Y, kar poleg identične avtosomske jedrne DNA in mDNA govori v prid temu, da obe kosti pripadata žrtvi JG.

Žrtev JG iz grobišča Konfin I, za katero smo kot primerjalni genetski material uporabili DNA še živeče sestre, smo pozitivno identifikirali, saj je izračunana naknadna verjetnost presejala vrednost 99,9% (115, 121, 122).

Tabela 1. Haplotipi regij HVI in HVII mDNA desnih stegnic 43 in 48 pat in sestre žrtve AK. CRS – cambsiška referenčna sekvenca, pat – patologija kosti, zlom.

Vzorec	Razlike glede na CRS	Območje
Desna stegnenica 43 pat	HVI: 16093C, 16224C, 16311C HVII: 73G, 152C, 263G, 315.1C	HVI: 16030–16381 HVII: 55–388
Desna stegnenica 48 pat	HVI: 16093C, 16224C, 16311C HVII: 73G, 152C, 263G, 315.1C	HVI: 16030–16381 HVII: 55–388
Sestra žrtve AK	HVI: 16093C, 16224C, 16311C HVII: 73G, 152C, 263G, 315.1C	HVI: 16030–16381 HVII: 55–388

Tabela 2. Genetski profili jedrne avtosomske DNA desnih stegnic 43 in 48 pat in sestre AK. Amelog. – odsek amelogeninskega gena, pat – patologija kosti, zlom.

Vzorec	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539
Desna stegnenica 43 pat	13 14	29 30	10 12	11 12	17 17	7 9.3	8 13	13 13
Desna stegnenica 48 pat	13 14	29 30	10 12	11 12	17 17	7 9.3	8 13	13 13
Sestra žrtve AK	14 14	30 33.2	10 11	10 12	17 17	7 9.3	8 13	12 13
Vzorec	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	Amelog.	D5S818	FGA
Desna stegnenica 43 pat	20 25	12 15	16 16	8 8	12 18	X Y	11 11	22 23
Desna stegnenica 48 pat	20 25	12 15	16 16	8 8	12 18	X Y	11 11	22 23
Sestra žrtve AK	23 25	12 13	14 16	8 8	12 14	X X	11 12	19 21

Tabela 3. Haplotipa kromosoma Y desnih stegnic 43 in 48 pat. pat – patologija kosti, zlom.

Vzorec	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385a/b	DYS393
Desna stegnenica 43 pat	18	13	26	29	14	15	11/15	13
Desna stegnenica 48 pat	18	13	26	29	14	15	11/15	13
Vzorec	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	DYSH4	DYS437	DYS438	DYS448
Desna stegnenica 43 pat	10	11	23	11	12	14	11	20
Desna stegnenica 48 pat	10	11	23	11	12	14	11	20

Z žrtvijo JG smo povezali dve fragmentirani stegenici, ki sta imeli identične genetske profile avtosomskih mikrosatelitov, mikrosatelitov kromosoma Y in mDNA, kar kaže na možnost, da prelomljeni kosti predstavljata proksimalni in distalni del iste kosti (v grobišču Konfin I je bilo 40 ranjencev, ki so bili prepeljani iz Bolnišnice Ljubljana na morišče in so imeli zlomljene ali amputirane ude). Pri identifikaciji žrtev iz grobišča Konfin I izključujemo možnost kontaminacije endogene DNA kosti med izkopom (pri zbiranju in shranjevanju kosti), med antropološko ter med genetsko preiskavo. Verodostojnost genetskih profilov kosti iz grobišča Konfin I potrjujejo čiste izolacijske in pomnoževalne negativne kontrole, ponovljivost rezultatov zaporednih pomnoževanj z različnimi pomnoževalnimi kompleti in neujemanje genetskih profilov kosti z osebami iz eliminacijske podatkovne zbirke.

ZAKLJUČEK

Ob upoštevanju mednarodnih priporočil in v našem laboratoriju razvitih postopkov smo uspešno identificirali žrtve povojnih pobojev iz grobišča Konfin I, Storžič in Bodoveljska grapa (23, 33–37). Opisane ekstrakcijske in tipizacijske metode za avtosomsko DNA, kromosom Y in mDNA so izredno učinkovite, saj smo iz več kot 65 let starih kosti in zob pridobili zelo kakovostno DNA, ki smo jo lahko pomnožili z uporabo komercialno dostopnih pomnoževalnih kompletov ter uspešno tipizirali ne le mDNA, temveč tudi jedrno DNA. Pokazalo se je, da je za identifikacijo starih skeletnih ostankov smiselno analizirati tako

jedrno avtosomsko DNA kot mDNA, v primeru sledenja paternalni liniji (preverjanju sorodstvenih povezav očetje, sinovi, bratje, bratranci, strici, nečaki) pa je treba v preiskavo vključiti tudi mikrosatelite kromosoma Y, saj z večjim številom genetskih označevalcev povečamo moč genetskega dokaza. Z uporabo večjega števila pomnoževalnih kompletov smo preverili istovetnost genetskih profilov kosti. Pri degradiranih vzorcih smo uporabili tudi komplet za pomnoževanje zelo kratkih avtosomskih mikrosatelitov. Ob ujemanju genetskih profilov kosti in zob s še živečimi sorodniki smo dosegali zelo visoke verjetnosti sorodstvenih povezav (te so presegle vrednost 99,9%), kar kaže na to, da smo preiskali zadostno število genetskih označevalcev za doseganje pozitivnih identifikacij in da smo v preiskavo vključili zadostno število sorodnikov, ki so bili tako v bližnjem kot daljnem sorodstvu z žrtvami. Žrtve smo identificirali s pomočjo še živečih bratov, sester, hčerk, sinov, bratrancev in nečakov po očetovi in po materini liniji. Zelo uspešni smo bili tudi pri preprečevanju kontaminacije endogene DNA kosti in zob s sodobno DNA. Verodostojnost genetskih profilov kosti in zob namreč potrjujejo čiste izolacijske in pomnoževalne negativne kontrole, ponovljivost rezultatov dveh zaporednih preiskav in neujemanje genetskih profilov z osebami iz eliminacijske podatkovne zbirke. Izkušnje, ki smo jih pridobili pri genetskih raziskavah skeletnih ostankov iz povojnih množičnih grobišč, so nam v veliko pomoč pri razvijanju metod za molekularno antropološke preiskave veliko starejših skeletnih ostankov iz arheoloških najdišč.

LITERATURA

1. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993; 362 (6422): 709–15.
2. Eglinton G, Logan GA. Molecular preservation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1991; 333 (1268): 315–28.
3. Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, et al. Ancient DNA. *Nat Rev Genet*. 2001; 2 (5): 353–9.
4. Pääbo S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86 (6): 1939–43.
5. Höss M, Jaruga P, Zastawny TH, et al. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res*. 1996; 24 (7): 1304–7.

6. Poinar HN, Hoss M, Bada JL, et al. Amino acid racemisation and the preservation of ancient DNA. *Science*. 1996; 272 (5263): 864–6.
7. Hagelberg E, Bell LS, Allen T, et al. Analyses of ancient bone DNA: techniques and applications. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1991; 333 (1268): 399–407.
8. Tuross N. The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia*. 1994; 50 (6): 530–5.
9. Smith CI, Chamberlain AT, Riley MS, et al. Neanderthal DNA. Not just old but old and cold? *Nature*. 2001; 410 (6830): 771–2.
10. Smith CI, Chamberlain AT, Riley MS, et al. The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *J Hum Evol*. 2003; 45 (3): 203–17.
11. Burger J, Hummel S, Hermann B, et al. DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis*. 1999; 20 (8): 1722–8.
12. Pruvost M, Schwarz R, Correia VB, et al. Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104 (3): 739–44.
13. Malmstrom H. Ancient DNA as a means to investigate the European Neolithic [doktorsko delo]. Uppsala (Švedska): Uppsala University; 2007.
14. Miloš A, Selmanović A, Smajlović L, et al. Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. *Croat Med J*. 2007; 48 (4): 486–93.
15. Misner LM, Halvorson AC, Dreier JL, et al. The correlation between skeletal weathering and DNA quality and quantity. *J Forensic Sci*. 2009; 54 (4): 822–8.
16. Edson SM, Ross JP, Coble MD, et al. Naming the dead – confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains. *Forensic Sci Reviews*. 2004; 16 (1): 64–89.
17. Zupanič Pajnič I. Forenzična genetika. *Med Razgl*. 2011; 50 (3): 325–40.
18. Noonan JP, Coop G, Kudaravalli S, et al. Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. *Science*. 2006; 314 (5802): 1113–8.
19. Valdiosera C, Garcia N, Dalen L, et al. Typing single polymorphic nucleotides in mitochondrial DNA as a way to access Middle Pleistocene DNA. *Biol Lett*. 2006; 2 (4): 601–3.
20. 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.
21. Hopwood AJ, Mannucci A, Sullivan KM. DNA typing from human faeces. *Int J Legal Med*. 1996; 108 (5): 237–43.
22. 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.
23. Zupanič Pajnič I. Identifikacija oseb iz starih in slabo ohranjenih bioloških materialov s polimorfizmi mitohondrijske DNA [doktorsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2007.
24. Handt O, Richards M, Trommsdorf M, et al. Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science*. 1994; 264 (5166): 1775–8.
25. Kolmann CJ, Tuross N. Ancient DNA analysis of human populations. *Am J Phys Anthropol*. 2000; 111 (1): 5–23.
26. Wandeler P, Smith S, Morin PA, et al. Patterns of nuclear DNA degradation over time—a case study in historic teeth samples. *Mol Ecol*. 2003; 12 (4): 1087–93.
27. Handt O, Krings M, Ward RH, et al. The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am J Hum Genet*. 1991; 59 (2): 368–76.
28. Brown TA, Brown KA. Ancient DNA and the archaeologist. *Antiquity*. 1992; 66 (250): 10–23.
29. Pääbo S. Amplifying ancient DNA. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al., eds. *PCR-Protocols and Amplifications*. San Diego: Academic Press; 1990. p. 159–66.
30. Pääbo S, Poinar H, Serre D, et al. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet*. 2004; 38: 645–79.
31. Ferenc M. Topografija evidentiranih grobišč. In: Dežman J, ed. *Poročilo Komisije vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč 2005–2008*. Ljubljana: Družina; 2008. p. 7–27.
32. Jamnik P. Ugotavljanje identitete žrtev iz brezna pri Konfinu I v arhivskih virih. In: Dežman J, ed. *Poročilo Komisije vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč 2005–2008*. Ljubljana: Družina; 2008. p. 83–93.
33. 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.
34. Zupanič-Pajnič I, Gornjak-Pogorelc 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.
35. Zupanič-Pajnič I. Identificirane žrtve grobišča pri Konfinu 1. In: Dežman J, ed. *Resnica in sočutje. Poročilo Komisije vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč 2009–2011*. Ljubljana: Družina; 2012. p. 113–88.
36. 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.
37. Zupanič-Pajnič I. Molekularno genetska identifikacija domobrskih žrtev. *Zdrav Vestn*. 2008; 77 (11): 745–50.

38. Pfeiffer H, Hühne J, Seitz B, et al. Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth. *Int J Legal Med.* 1999; 112 (2): 142-4.
39. Sweet D, Hildebrand D. Recovery of DNA from human teeth by cryogenic grinding. *J Forensic Sci.* 1998; 43 (6): 1199-202.
40. Alvarez Garcia A, Munoz I, Pestoni C, et al. Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp. *Int J Legal Med.* 1996; 109 (3): 125-9.
41. Ohira H, Yamada Y. Advantages of dental mitochondrial DNA from detection and classification of the sequence variation using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Forensic Med Pathol.* 1999; 20 (3): 261-8.
42. Schwartz TR, Schwartz EA, Mieszerski L, et al. Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. *J Forensic Sci.* 1991; 36 (4): 979-90.
43. Pfeiffer H, Steighner R, Fisher R, et al. Mitochondrial DNA extraction and typing from isolated dentin-experimental evaluation in Korean population. *Int J Legal Med.* 1998; 111 (6): 309-13.
44. Smith BC, Fisher DL, Weedn VW, et al. A systematic approach to the sampling of dental DNA. *J Forensic Sci.* 1993; 38 (5): 1194-209.
45. Budowle B, Smith J, Moretti T, et al. DNA typing protocols: molecular biology and forensic analysis. Washington: Eaton Publishing; 2000. p. 304.
46. Boles CT, Snow CC, Stover E. Forensic DNA testing on skeletal remains from mass graves: a pilot project in Guatemala. *J Forensic Sci.* 1995; 40 (3): 349-55.
47. Mörnstad H, Pfeiffer H, Yoon C, et al. Demonstration and semi-quantification of mtDNA from human dentine and its relation to age. *Int J Legal Med.* 1999; 112 (2): 98-100.
48. Gaytmenn R, Sweet D. Quantification of forensic DNA from various regions of human teeth. *J Forensic Sci.* 2003; 48 (3): 622-5.
49. Tsuchimochi T, Iwasa M, Maeno Y, et al. Chelating resin-based extraction of DNA from dental pulp and sex determination from incinerated teeth with Y-chromosomal aliphoid repeat and short tandem repeats. *Am J Forensic Med Pathol.* 2002; 23 (3): 268-71.
50. Sweet DJ, Sweet CH. DNA analysis of dental pulp to link incinerated remains of homicide victim to crime scene. *J Forensic Sci.* 1995; 40 (2): 310-4.
51. Sweet D, Hildebrand D, Phillips D. Identification of skeleton using DNA from teeth and a PAP smear. *J Forensic Sci.* 1999; 44 (3): 630-3.
52. Baker LE, McCormick WF, Matteson KJ. A silica-based mitochondrial DNA extraction method applied to forensic hair shafts and teeth. *J Forensic Sci.* 2001; 46 (1): 126-30.
53. Hochmeister MN, Budowle MD, Borer UV, et al. Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. *J Forensic Sci.* 1991; 36 (6): 1649-61.
54. Petrovič D, Zorc M, eds. *Histologija*. Ljubljana: Inštitut za histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani; 2005. p. 35-42, p. 115-23, p. 166-8.
55. Kemp BM, Smith DG. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Sci Int.* 2005; 154 (1): 53-61.
56. Zupanič Pajnič I, Gornjak Pogorelec B, Balažič J, et al. Highly efficient nuclear DNA typing of the World War II skeletal remains using three new autosomal short tandem repeat amplification kits with the extended European Standard Set of loci. *Croat Med J.* 2012; 53 (1): 17-23.
57. Lee H, Pagliaro E, Berka K, et al. Genetic markers in human bone: I. deoxyribonucleic acid (DNA) analysis. *J Forensic Sci.* 1991; 36 (2): 320-30.
58. Hochmeister MN, Budowle B, Borer V, et al. Confirmation of the identity of human skeletal remains using multiplex PCR amplification and typing kits. *J Forensic Sci.* 1995; 40 (4): 701-5.
59. Hagelberg E, Sykes B, Hedges R. Ancient bone DNA amplified. *Nature.* 1989; 342 (6249): 485.
60. Hagelberg E, Gray IC, Jeffreys AJ. Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature.* 1991; 352 (6334): 427-9.
61. Yamamoto T, Uchihira R, Kojima T, et al. Maternal identification from skeletal remains of an infant kept by the alleged mother for 16 years with DNA typing. *J Forensic Sci.* 1998; 43 (3): 701-5.
62. Tahir MA, Balraj E, Luke L, et al. DNA typing of samples for polymarker DQA1 and nine STR loci from human body exhumed after 27 years. *J Forensic Sci.* 2000; 45 (4): 902-7.
63. Leonart 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.
64. Alonso A, Andelinović Š, Martin P, et al. 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 (3): 260-6.
65. 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.
66. Irwin JA, Edson SM, Loreille O, et al. DNA identification of »Earthquake McGoon« 50 years postmortem. *J Forensic Sci.* 2007; 52: 1115-8.

67. 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 (5): 1322-7.
68. Marjanović D, Durmić-Pašić A, Bakal N, et al. DNA identification of skeletal remains from World War II mass graves uncovered in Slovenia. *Croat Med J.* 2007; 48 (4): 513-9.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. Stone AC, Starrs JE, Stoneking M. Mitochondrial DNA analysis of the presumptive remains of Jesse James. *J Forensic Sci.* 2001; 46 (1): 173-6.
74. Palo JU, Hedman M, Soderholm N, et al. Repatriation and identification of Finnish World War II soldiers. *Croat Med J.* 2007; 48 (4): 528-35.
75. Jehaes E. Mitochondrial DNA analysis on remains of a putative son of Louis XVI, King of France and Marie-Antoinette. *Europ J Hum Gen.* 1998; 6 (4): 383-95.
76. Sullivan KM, Hopgood R, Gill P. Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA. *Int J Legal Med.* 1992; 105 (2): 83-6.
77. 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.
78. Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, et al. mtDNA as a tool for identification of human remains – identification using mtDNA. *Int J Legal Med.* 1996; 109 (4): 205-9.
79. Bender K, Schneider PM, Rittner C. Application of mtDNA sequence analysis in forensic casework for the identification of human remains. *Forensic Sci Int.* 2000; 113 (1-3): 103-7.
80. Seo Y, Uchiyama T, Shimizu K, et al. Identification of remains by sequencing of mitochondrial DNA control region. *Am J Forensic Med Pathol.* 2000; 21 (2): 138-43.
81. Koyama H, Iwasa M, Ohtani S, et al. Personal identification from human remains by mitochondrial DNA sequencing. *Am J Forensic Med Pathol.* 2002; 23 (3): 272-6.
82. Prince AM, Andrus L. PCR how to kill unwanted DNA. *Biotechniques.* 1992; 12 (3): 358-60.
83. Rennick SL, Fenton TW, Foran DR. The effects of skeletal preparation techniques on DNA from human and non-human bone. *J Forensic Sci.* 2005; 50 (5): 1016-9.
84. 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.
85. Carracedo A, Bär W, Lincoln P, et al. DNA commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int.* 2000; 110 (2): 79-85.
86. Wilson MR, DiZinno JA, Polansky D, et al. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *Int J Legal Med.* 1995; 108 (2): 68-74.
87. Kalmar T, Bachrati CZ, Marcsik A, et al. A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28 (12): e67.
88. Tamariz J, Voynarovska K, Prinz M, et al. 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 (4): 790-4.
89. Shaw K, Sesardić I, Bristol N, et al. Comparison of the effects of sterilisation techniques on subsequent DNA profiling. *Int J Legal Med.* 2008; 122 (1): 29-33.
90. 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.
91. 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.
92. Graham EAM. DNA reviews: Ancient DNA. *Forensic Sci Med Pathol.* 2007; 3: 221-5.
93. Cattaneo C, Craig OE, James NT, et al. Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences. *J Forensic Sci.* 1997; 42 (6): 1126-35.
94. Loreille OM, Diegoli TM, Irwin JA, et al. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Sci Int Genet.* 2007; 1 (2): 191-5.
95. Salamon M, Tuross N, Arensburg B, et al. Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102 (39): 13783-8.

96. Gilbert MTP, Rudbeck L, Willerslev E, et al. Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological bone and teeth excavated at Matera, Italy. *J Archaeol Sci.* 2005; 32 (5): 785–93.
97. Sampiarto ML, Gilbert MT, Lao O, et al. Tracking down human contamination in ancient human teeth. *Mol Biol Evol.* 2006; 23 (9): 1801–7.
98. Zupanič Pajnič I. Visoko učinkovita metoda ekstrakcije DNA iz skeletnih ostankov. *Zdrav Vestn.* 2011; 80: 171–81.
99. Rohland N, Hofreiter M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nat Protoc.* 2007; 2 (7): 1756–62.
100. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clinical Microb.* 1990; 28 (3): 495–503.
101. Nagy M, Otremba P, Krüger C, et al. Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads technology in forensics. *Forensic Sci Int.* 2005; 152 (1): 13–22.
102. Kishore R, Hardy WR, Anderson VJ, et al. Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the biorobot EZ1 and biorobot M48. *J Forensic Sci.* 2006; 51 (5): 1055–61.
103. Valgren C, Wester S, Hansson O. A comparison of three automated DNA purification methods in forensic casework. *Forensic Sci Int: Genetics Supplement Series.* 2008; 1 (1): 76–7.
104. Montpetit SA, Fitch IT, O'Donnell PT. A simple automated instrument for DNA extraction in forensic casework. *J Forensic Sci.* 2005; 50 (3): 555–63.
105. Alonso A, Martin P, Albarran C, et al. Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Sci Int.* 2004; 139 (2–3): 141–9.
106. Andresson H, Nilsson M, Budowle B, et al. Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials. *Forensic Sci Int.* 2006; 164 (1): 56–64.
107. Alonso A, Martin P, Albarran C, et al. Specific quantification of human genomes from low copy number DNA samples in forensic and ancient DNA studies. *Croat Med J.* 2003; 44 (3): 273–80.
108. Andresson H, Gyllensten U, Allen M. Real-time DNA quantification of nuclear and mitochondrial DNA in forensic analysis. *Bio Techniques.* 2002; 33 (2): 402–11.
109. 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.
110. Parson W, Parsons TJ, Scheithauer R, et al. Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences: Application of mDNA sequence analysis to a forensic case. *Int J Legal Med.* 1998; 111 (3): 124–32.
111. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981; 290 (5806): 457–65.
112. 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.
113. 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.
114. Zupanič I. Uvedba preiskave DNA za prepoznavanje oseb in preverjanje sorodstvenih povezav v slovenski populaciji [magistrska naloga]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 1999.
115. Brenner CH, Weir BS. Issues and strategies in the DNA identification of World Trade Center victims. *Theoret Popul Biol.* 2003; 63 (3): 173–8.
116. 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.
117. Willuweit S, Roewer L. Y chromosome haplotype reference database (YHRD): Update. *Forensic Sci Int Genet.* 2007; 1 (2): 83–7.
118. Parson W, Dür A. EMPOP – a forensic mtDNA database. *Forensic Sci Int Genet.* 2007; 1 (2): 88–92.
119. Balding DJ, Nichols RA. DNA profile match probability calculation: how to allow for population stratification, relatedness, database selection and single bands. *Forensic Sci Int.* 1994; 64 (2–3): 125–40.
120. Walsh B, Redd AJ, Hammer MF. Joint match probabilities for Y chromosomal and autosomal markers. *Forensic Sci Int.* 2008; 174 (2–3): 234–8.
121. 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.
122. 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.
123. 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.