

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARCEL OBAL

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARCEL OBAL

**UPORABA RAZLIČNIH SKELETNIH ELEMENTOV ZA
GENETSKO IDENTIFIKACIJO ŽRTEV DRUGE SVETOVNE
VOJNE**

**DIFFERENT SKELETAL ELEMENTS AS A SOURCE OF DNA FOR
GENETIC IDENTIFICATION OF SECOND WORLD WAR VICTIMS**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljal na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Darka Černeta in somentorstvom znanstvene svetnice in doc. dr. Irene Zupanič Pajnič. Praktični del magistrske naloge sem opravil na Inštitutu za sodno medicino Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

ZAHVALA

Iskrena hvala za mentorstvo, vzpodbudo, trud in sodelovanje pri magistrski nalogi mentorju prof. dr. Darku Černetu.

Ogromna zahvala gre somentorici znanstveni svetnici in doc. dr. Ireni Zupanič Pjanič; hvala za dano priložnost, izkazano zaupanje in strokovne nasvete – brez tega moja vključitev v raziskovalno delo na Inštitutu za sodno medicino ne bi bila mogoča.

Hvala Katji Vodopivec Mohorčič in mag. Barbari Gornjak Pogorelc, ki sta skozi moje raziskovanje vedno bili pripravljeni pomagati in tako mnogokrat olajšali moje delo v laboratoriju.

Neizmerna hvala moji družini za brezpogojno podporo na moji akademski poti. Hvala tudi vsem prijateljem, ki so in še vedno vztrajajo z mano; brez njih bi bila marsikatera pot, še posebej pa ta, neprimerno daljša.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Darka Černeta. Naloga je del projekta J3-8214 (Določitev najprimernejših skeletnih elementov za molekularno genetsko identifikacijo starih človeških posmrtnih ostankov), ki ga financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije iz državnega proračuna in poteka pod vodstvom znanstvene svetnice in doc. dr. Irene Zupanič Pajnič.

Marcel Obal

Komisija za zagovor

Predsednik: prof. dr. Janko Kos

Mentor: prof. dr. Darko Černe

Somentorica: znanstvena svetnica in doc. dr. Irena Zupanič Pajnič

Član komisije: asist. dr. Nejc Horvat

KAZALA

KAZALO VSEBINE

Kazala	IV
Kazalo vsebine.....	IV
Kazalo preglednic.....	V
Kazalo slik	VI
Povzetek	VII
Abstract.....	VIII
Abecedni seznam okrajšav	X
Uvod	1
Starodavna DNA	1
Kosti in zobje.....	2
Kosti.....	2
Zobje.....	5
Raziskave o uporabnosti različnih skeletnih elementov v namen izolacije DNA in genotipizacije.....	9
Dedovanje DNA.....	11
Avtosomska jedrna DNA in kratki polimorfni odseki v forenzičnih molekularnogenetskih preiskavah.....	11
Namen dela in delovne hipoteze.....	16
Materiali in metode	17
Shematski prikaz poteka dela	17
Vzorci.....	17
Skeleti iz grobišča Huda jama.....	17
Skeleti iz grobišča Babna Gora.....	18
Eliminacijska zbirka genetskih profilov	19
Preprečevane kontaminacije	19
Izolacija DNA (priprava reagentov in vzorcev, ekstrakcija in čiščenje DNA).....	21
Čiščenje kosti in zob	23
Mletje kosti in zob ter demineralizacija	24
Ekstrakcija in čiščenje DNA.....	26
Kvantifikacija DNA z RT-PCR (določitev količine DNA v ekstraktih z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času)	28
Profil DNA	34
Pomnoževanje lokusov STR v reakciji PCR (tipizacija lokusov STR).....	35
Elektroforezna ločba in detekcija pomnoženih in označenih fragmentov DNA.....	42
Statistični izračuni verjetnosti sorodstvenih povezav	44
Obdelava podatkov.....	45
Rezultati in razprava	46
Iskanje najprimernejšega skeletnega elementa za identifikacijo žrtev druge svetovne vojne – grobišče Huda jama.....	46
Rezultati kvantifikacije.....	46
Rezultati genotipizacije lokusov STR.....	60
Elektroferogrami	60
Identifikacija žrtev iz grobišča Babna Gora	76
Rezultati kvantifikacije.....	76
Rezultati genotipizacije avtosomskih področij STR	77

Rezultati tipizacije haplotipov kromosoma Y	81
Genotipizacija DNA oseb v eliminacijski zbirki	83
Izračuni statistične verjetnosti sorodstva	83
Zaključek	87
Viri	i
Priloge	x

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Prikaz posameznih komponent reakcijske zmesi in njihovih volumnov za kvantifikacijo enega vzorca	33
Preglednica II: Amplifikacijski kompleti z lokusi, ki jih pomnožujejo, ter vzorci, ki smo jih s posameznim kompletom pomnožili.....	37
Preglednica III.: Sestava reakcijske mešanice za amplifikacijo s kompletom ESSplex SE QS (Qiagen).....	39
Preglednica IV: Sestava reakcijske mešanice za amplifikacijo s kompletom Investigator ESSplex Plus (Qiagen).	40
Preglednica V: Sestava reakcijske mešanice za amplifikacijo s kompletom PowerPlex® Y23 System (Promega).	40
Preglednica VI: Sestava reakcijske mešanice za amplifikacijo s kompletom PowerPlex® ESI 17 Pro System (Promega).....	41
Preglednica VII: Sestava reakcijske mešanice za amplifikacijo s kompletom AmpFISTR® NGM™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific).	41
Preglednica VIII: Rezultati kvantifikacije in genotipizacije skeleta A iz grobišča Huda jama.....	49
Preglednica IX: Rezultati kvantifikacije in genotipizacije skeleta B iz grobišča Huda jama.....	52
Preglednica X: Rezultati kvantifikacije in genotipizacije skeleta C iz grobišča Huda jama.....	54
Preglednica XI: Povprečna količina DNA v ng/g kosti oziroma zob, število celotnih profilov in povprečno število pomnoženih lokusov za posamezni element v vseh treh skeletih.....	57
Preglednica XII: Zbrani genetski profili skeletov A, B in C iz grobišča Huda jama.....	68
Preglednica XIII: Eliminacijska zbirka genetskih profilov za vzorce iz grobišča Huda jama.....	75
Preglednica XIV: Rezultati kvantifikacije za DNA izolirano iz kosti, najdene v moškem in ženskem grobišču Babna Gora.....	77
Preglednica XV: Prikaz števila uspešno pomnoženih lokusov pri analiziranih vzorcih glede na amplifikacijski komplet.	78
Preglednica XVI: Rezultati tipizacije avtosomskih STR področij žrtev in dveh še živečih sorodnikov.	79
Preglednica XVII: Rezultati tipizacije haplotipov kromosoma Y moških žrtev in živečega moškega sorodnika.....	82
Preglednica XVIII: Profili oseb v eliminacijski zbirki za vzorce grobišča Babna Gora. 83	

KAZALO SLIK

Slika 1: Vzdolžni prerez dolge kosti.....	3
Slika 2: Sestava spongiozne kostnine.....	5
Slika 3: Vzdolžni prerez in sestava zoba z dlesnijo in alveolarno kostjo.	6
Slika 4: Vzorci enostavne, sestavljene in kompleksne ponovitve STR - področij.	13
Slika 5: PowerPlex® Y23 System.	15
Slika 6: Shematski prikaz čiščenja DNA v napravi BioRobot EZ1 s kompletom EZ1 DNA Investigator Kit.....	27
Slika 7: Prikaz vezave in razgradnje hidrolizirajoče sonde na tarčni odsek enoverižne DNA.	30
Slika 8: Shematski prikaz postopka kvantifikacije.....	34
Slika 9: Shematski prikaz poteka enega cikla reakcije PCR.....	35
Slika 10: Shematski prikaz ločbe in detekcije pomnoženih fragmentov s kapilarno elektroforezo.	43
Slika 11: Skeletni elementi naraščajoče razvrščeni glede na povprečno količino DNA (ng/g kosti oziroma zoba) v vseh treh skeletih.	59
Slika 12: Elektroferogram skeleta A, vzorec 5, pogačica, 17/17.	60
Slika 13: Elektroferogram skeleta A, vzorec 2, golenica, 17/17.	61
Slika 14: Elektroferogram skeleta A, vzorec 76, dlančnica I, 17/17.	61
Slika 15: Elektroferogram skeleta A, vzorec 166, proks. prstnica palca roke, 16/17.	62
Slika 16: Elektroferogram skeleta A, vzorec 7, zatilnica, < 8 lokusov.	62
Slika 17: Elektroferogram skeleta B, vzorec 17, stopalnica I, 17/17.....	63
Slika 18: Elektroferogram skeleta B, vzorec 52, stopalnica V, 17/17.....	63
Slika 19: Elektroferogram skeleta B, vzorec 15, mečnica, 16/17.....	64
Slika 20: Elektroferogram skeleta B, vzorec 44, zgornji podočnik, < 8 lokusov.....	64
Slika 21: Elektroferogram skeleta C, vzorec 141, skočnica, 17/17.	65
Slika 22: Elektroferogram skeleta C, vzorec 128, golenica, 17/17.	65
Slika 23: Elektroferogram skeleta C, vzorec 149, distalna prstnica palca noge, 17/17.	66
Slika 24: Elektroferogram skeleta C, vzorec 109, zgornji ličnik, < 8 lokusov.	66
Slika 25: Elektroferogram, negativna kontrola reakcije PCR.....	67
Slika 26: Elektroferogram, negativna kontrola ekstrakcije serije 11.	67
Slika 27: Prikaz števila uspešno pomnoženih lokusov STR po skeletih glede na vrsto skeletnega elementa.	69
Slika 28: Družinsko drevo žrtev iz grobišča Babna Gora s prikazanimi pokojnimi in še živečimi sorodniki ter sorodstvenimi vezmi.....	76

POVZETEK

V genetskih sodnomoedicinskih preiskavah predstavlja identifikacija pogrešanih oseb še vedno izziv, saj so skeletizirani posmrtni ostanki, na katere smo se v magistrski nalogi osredotočili, pogosto v slabem stanju, težaven pa je tudi izbor skeletnih elementov, ki bi omogočili pridobitev kar se da kvalitetnih rezultatov. Na ohranjenost deoksiribonukleinske kisline (DNA) v skeletnih ostankih vplivajo individualno specifični dejavniki (spol, starost), bolj pa dejavniki okolja ter čas od smrti do najdbe. V nalogi smo z analizo treh približno 70 let starih skeletov iz prikritega povojnega grobišča Huda jama (skupno smo preiskovali 168 skeletnih elementov) s pomočjo različnih parametrov, kot so količina DNA, stopnja degradacije le-te in uspešnost njene tipizacije, iskali skeletne elemente, ki bi bili za identifikacijo žrtev druge svetovne vojne najbolj primerni. Analiza je obsegala čiščenje in mletje kosti in zob, ekstrakcijo in čiščenje DNA, določitev količine DNA v ekstraktih z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času, PCR - pomnoževanje in analizo specifičnih področij kratkih tandemskih ponovitev (lokusi STR) in pridobitev ter interpretacijo avtosomskih genetskih profilov. Najbolj povedna parametra sta količina DNA v nanogramih na gram kostnega in zobnega prahu in uspešnost tipizacije, ki smo jo definirali kot število uspešno pomnoženih lokusov STR za posamezni skeletni element pri treh analiziranih skeletih. Kot najprimernejše skeletne elemente smo določili vse dlančnice (I-V), vse stopalnice (I-V), intermedialno klinasto kost stopala, distalno prstnico palca noge, skočnico, senčnico (skalnico) in golenico, ki so pri vseh preiskovanih skeletih dali kompletne genetske profile. Seznam lahko razširimo na 25 skeletnih elementov - dodamo tiste, ki so dali delne profile z izpadom enega samega lokusa STR: glavatico, proksimalno prstnico palca roke, proksimalno prstnico palca noge, medialno klinasto kost, pogačico, čolnič, distalno prstnico palca roke, petnico, lateralno klinasto kost in kocko. Ustvarili smo eliminacijsko zbirko z genetskimi profili oseb, ki smo sodelovale na vseh stopnjah rokovanja z vzorci ter primerjali profile s profili treh analiziranih skeletov in ob neujemanju izključili možnost kontaminacije. V končnem delu smo opravili identifikacijo sedmih žrtev prikritega medvojnega grobišča Babna Gora, kjer smo z analizo treh ženskih in štirih moških skeletov uspeli identificirati tri moške (očeta in dva strica referenčnih oseb) in eno žensko žrtev poboja (teto referenčnih oseb); pri slednji moramo za dokončno identifikacijo v preiskavo vključiti dodatne avtosomske genetske označevalce. S primerjavo avtosomskih genetskih profilov in pri moških tudi haplotipov kromosoma Y

smo s pomočjo dveh še živečih sorodnikov (referenčnih oseb) poiskali ujemanje in statistično ovrednotili verjetnost sorodstva.

Ključne besede: identifikacija žrtev, forenzična genetika, skeletizirani posrmtni ostanki, množična grobišča, genopitizacija

ABSTRACT

In forensic genetics investigations identification of missing persons is still a challenge, because skeletonized human remains, which we focused on in this thesis, are often in bad condition when discovered, which makes it harder to perform a sampling that would optimize analysis and give the most quality results. Preservance of deoxyribonucleic acid (DNA) in skeletal remains depends on individually specific factors, such as biological sex and age and even more on environmental factors and post mortem interval. In this thesis we analyzed three approximately 70 year-old skeletons, total of 168 skeletal elements from hidden Second World War mass grave Huda jama. With the help of parameters, such as quantity of DNA, degradation rate and typing success, we tried to find the best types of elements to identify the victims. Analysis was composed of cleaning and grinding bones and teeth, extraction and purification of DNA, its quantification with real time polymerase chain reaction (RT-PCR), analysis of short tandem repeats (STR) and creation and interpretation of autosomal genetic profiles. The best parameters were quantity (in nanograms of DNA per gram of bone or tooth powder) and typing success which we defined as a number of successfully amplified loci for specific skeletal elements in three of the examined skeletons. Best 15 skeletal elements to use as a source of DNA are metacarpal bones (I-V), metatarsal bones (I-V), intermediate cuneiform, distal phalanx (foot), talus, petrous bone and tibia from all of which we were able to create complete genetic profile in all three examined skeletons. If we expand this list to skeletal elements that generated partial profiles with drop out of only one STR locus, we can add capitata, first proximal phalanx of both foot and hand, medial cuneiform, patella, navicular, 1st distal hand phalang, calcaneus, lateral cuneiform and cuboid. We also created genetic profiles of everyone involved in any step of the analysis to compare them to sample profiles and exclude potential contamination. Furthermore we tried to identify seven victims found in hidden mass grave Babna Gora where we examined three female and four

male skeletons and successfully managed to identify three male (father and two uncles) and one female victim (aunt), though to complete identification of the female victim, more autosomal markers should be included in analysis. We compared autosomal genetic profiles of the victims and Y-haplotypes of male victims to those of the two living relatives (references) and found them matching, so we statistically evaluated probability of kinship.

Keywords: victim identification, forensic genetics, skeletal remains, mass graves, genotyping

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

cRNA	nosilna RNA (<i>angl. carrier RNA</i>)
Ct	cikel praga detekcije (<i>angl. Cycle threshold</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DTT	ditiotritol
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina (<i>angl. Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
gDNA	genomska DNA
HO	navidezni homozigot
IPC	notranja pozitivna kontrola
LR	verjetnostno razmerje (<i>angl. Likelihood ratio</i>)
mtDNA	mitohondrijska DNA
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>angl. Polymerase Chain Reaction</i>)
PP	naknadna verjetnost (<i>angl. Posterior probability</i>)
RFU	relativne enote fluorescence (<i>angl. Relative Fluorescence Units</i>)
UV	ultravijolično
RNA	ribonukleinska kislina
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (<i>angl. Real Time Polymerase Chain Reaction</i>)
SNP	polimorfizem enega nukleotida (<i>angl. Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SR micro-CT	sinhotrona radiacijska mikro računalniška tomografija (<i>angl. Synchrotron Radiation Micro-Computed Tomography</i>)
STR	kratka tandemska ponovitev, mikrosatelit (<i>angl. Short Tandem Repeat</i>)
VNTR	variabilno število tandemskih ponovitev, minisatelit (<i>angl. Variable Number Tandem Repeats</i>)
YHRD	referenčna podatkovna zbirka haplotipov kromosoma Y (<i>angl. Y Chromosome Haplotype Reference Database</i>)

UVOD

Od začetka devetdesetih let se kot glavno orodje v namen identifikacije oseb, preverjanja sorodstvenih povezav, kriminalistike in drugih forenzičnih preiskav uporabljajo analize deoksiribonukleinske kisline (DNA). Kljub bliskovitemu in močnemu razvoju področja, tovrstne preiskave še vedno predstavljajo izziv; zaradi svoje strukture se najdlje in najboljše ohranijo kosti in zobje, zato so običajno najboljši in pogosto edini vir DNA, vendar pa ohranjenost in količina molekul DNA močno odvisi od ohranjenosti teh tkiv, na kar vplivajo dejavniki, ki so jim tkiva podvržena pred, predvsem pa po smrti organizma - med slednjimi so najvplivnejši okoljski dejavniki (1). Ocena primernosti kosti in zob za genotipizacijo je zato težavna, genetske preiskave so pogosto neuspešne, v najboljših primerih drage. Posledično se mnogo novejših raziskav usmerja v iskanje najprimernejših skeletnih elementov, katerih analiza bi v največji meri omogočila pridobitev kar se da dobro ohranjene in zadostne količine DNA za genetsko identifikacijo (25, 26).

STARODAVNA DNA

Ko se v genetskih analizah uporablja DNA, izolirana iz slabo ohranjenih, lahko več stoletij ali celo tisočletij starih ostankov organizmov, govorimo o starodavni DNA, ki nam omogoča preučevanje teh organizmov ter nudi vpogled v mehanizme njihove evolucije. Začetki segajo v leto 1984, ko so iz mišičnega tkiva 140 let starega muzejskega primerka sorodnika zebre (*Equus quagga*), predhodno 100 let izumrle vrste, uspešno izolirali DNA, leto pozneje pa so izolacijo uspešno izvedli na 2400 let stari egipčanski mumiji. Področje je doživelo bliskovit razvoj nekaj let pozneje z odkritjem verižne reakcije s polimerazo (PCR), kar je omogočilo preučevanje zelo majhnih količin in tarčno specifičnih odsekov DNA, dodatno pa se je okrepilo z razvojem novejših, visoko zmogljivih tehnik sekvenciranja (2).

V živem organizmu za popravilo poškodovane DNA skrbijo posebni mehanizmi, ki po smrti ne delujejo več, saj se celično ravnovesje poruši. Poškodbe DNA se zaradi izpostavitve bakterijam, glivam in nukleazam kljub temu še naprej dogajajo, zaradi česar po smrti organizma preživi malo intaktne DNA, ki je običajno poškodovana in zelo fragmentirana, posledično postaja razmerje med številom fragmentov posamezne dolžine

in njihovo dolžino obratno sorazmerno; najdaljših fragmentov DNA se ohrani najmanj (2, 3, 7).

Proučevanje DNA, izolirane iz različno starih posmrtnih ostankov, najdenih na različnih lokacijah dokazuje, da na ohranjenost DNA ne vpliva zgolj čas, ki je pretekel od smrti organizma, temveč predvsem okolje, v katerem se je organizem po smrti nahajal. Prisotnost soli, izpostavitve sevanju, pH, dostop kisika in vlage, prisotnost mikroorganizmov ter temperatura so glavni dejavniki iz okolja, ki vplivajo na ohranjenost (2, 3, 4). Poleg fragmentacije lahko pod vplivom teh dejavnikov pride tudi do navzkrižnega povezovanja verig in sprememb ter delecij v nukleotidnem zaporedju (4).

Najprimernejši pogoji za dobro ohranjenost DNA so nizka izpostavljenost ultravijoličnemu (UV) sevanju, hitra izsušitev posmrtnih ostankov, nizka vlažnost, visoka koncentracija soli, rahlo bazičen ali nevtralen pH, nizka vsebnost huminskih kislin, odsotnost mikroorganizmov in predvsem nizka temperatura, ki je ključnega pomena (7). Vzorci podobne starosti, shranjeni pri nizkih temperaturah, so boljše ohranjeni kot tisti, ki so bili izpostavljeni višjim temperaturam. Kljub temu pa se kvaliteta in ohranjenost izolirane DNA razlikuje tudi v vzorcih, ki so bili najdeni v navidezno podobnih okoljih in bili izpostavljeni podobnim pogojem (4).

KOSTI IN ZOBJE

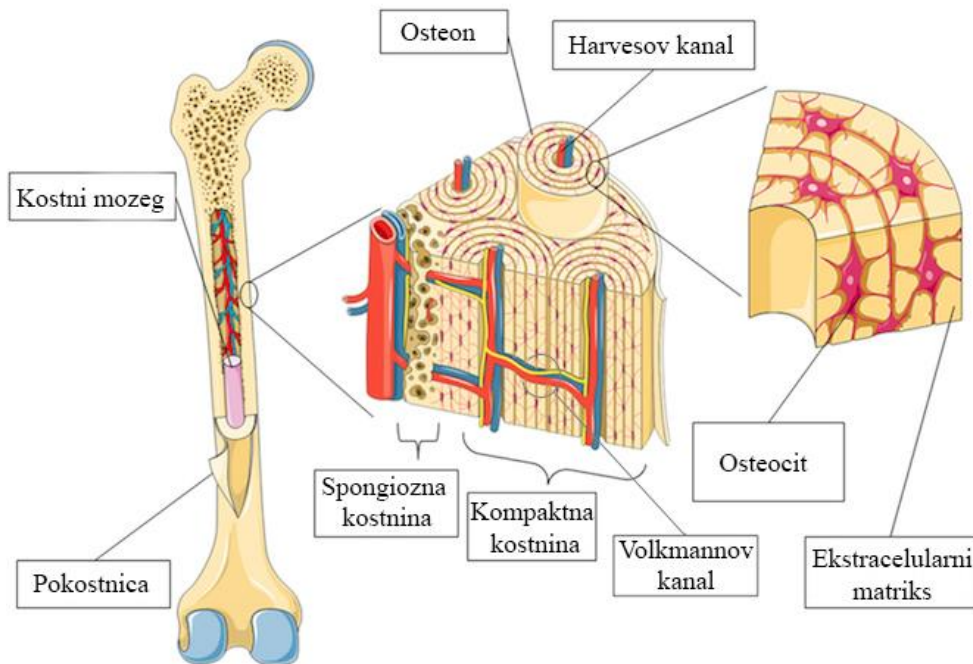
Kosti

Razumevanje sestave in poteka razgradnje kosti sta ključna dejavnika pri določanju nahajališča DNA v kosteh in posledično igrata pomembno vlogo pri izbiri primernih vzorcev za pridobitev in preučevanje DNA.

Makroskopsko delimo kostnino na kompaktno in spongiozno. Kompaktna sestavlja zunanji del koncev dolgih kosti (epifiza) in ploščatih kosti ter srednji del dolgih kosti (diafiza). Spongiozno najdemo v notranjosti ploščatih kosti in v koncih dolgih kosti. Srednji deli dolgih kosti so znotraj votli - prostor imenujemo medularni kanal, zapolnjuje ga rumeni kostni mozeg (4, 32). Kompaktno kostnino sestavljajo ponavljajoče se strukturne enote, imenovane osteoni. Skozi središče vsakega izmed njih vzdolž kosti poteka centralni (Harvesov) kanal, v katerem so krvne in limfne žile ter živci, prečno pa Harvesove kanale med seboj povezujejo Volkmannovi kanali. V vsakem osteonu Harvesov kanal obdajajo

koncentrične lamele, med njimi pa so področja, imenovana lakune, v katerih se nahajajo zrele kostne celice osteociti. Lakune so med seboj povezane s kanalikuli, majhnimi kanali, ki sodelujejo pri prenosu hranilnih snovi iz Harvesovega kanala do osteocita in pri odvajanju odpadnih snovi iz osteocita. Spongiozna kostnina ne vsebuje osteonov, temveč jo sestavljajo trabekule, premrežene kostne ploščice, ki prav tako vsebujejo lamele, lakune, osteocite in kanalikule, ter rdeč kostni mozeg, ki vsebuje krvne žile, ki prehranjujejo osteocite. Zaradi krhkosti spongiozne kostnine le-ta potrebuje zunanjo zaščitno plast kompaktne kostnine (10).

Na **Sliki 1** je prikazan vzdolžni prerez dolge kosti s prikazanim kostnim mozgom in sestava kostnine s prikazanimi spongiozno kostnino, kompaktno kostnino, osteoni, Harvesovimi kanali, Volkmannovimi kanali, osteociti in ekstracelularnim matriksom.



Slika 1: Vzdolžni prerez dolge kosti. Slika povzeta po (31).

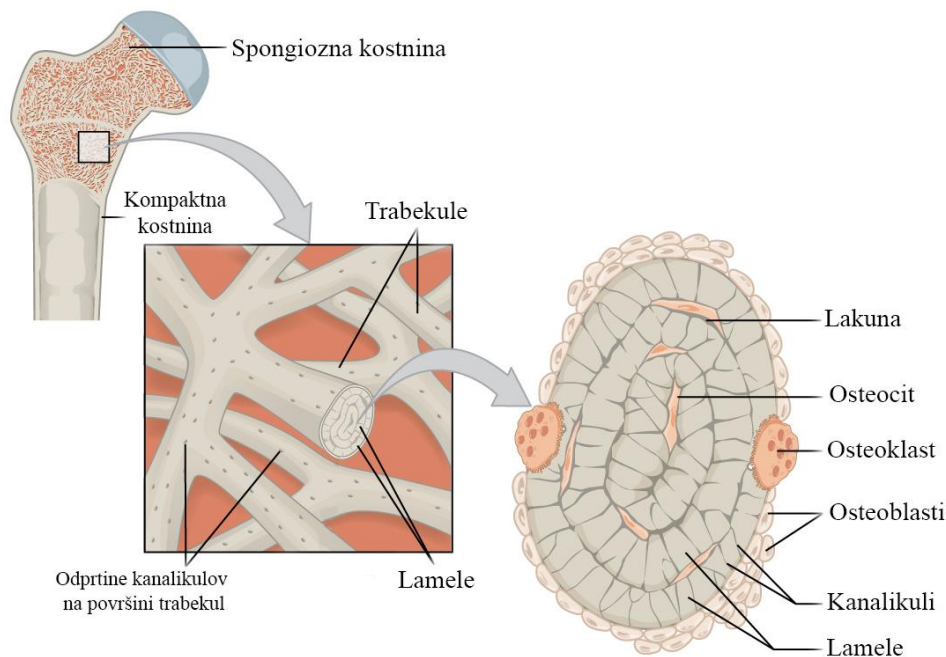
Mikroskopsko kost sestavljajo celice in medceličnina. Medceličnina sestoji iz organskega in anorganskega dela. Organski del v največji meri predstavlja kolagen tipa I in nekateri drugi proteini in glikoproteini (glikozaminoglikani, osteokalcin, osteonektin, osteopontin, sialoprotein), anorganski del pa hidroksiapatit, sestavljen iz kalcijevih in fosfatnih ionov. Celice, ki sestavljajo kosti, so osteoblasti, osteociti in osteoklasti ter sodelujejo v gradnji, resorpciji in mineralizaciji kosti. Aktivni osteoblasti so nezrele kostne celice in sodelujejo pri izgradnji medceličnine; izločajo hormone (prostaglandine) in encim (alkalna fosfataza),

ki sodelujejo pri mineralizaciji, prav tako pa izločajo organski del kostnega matriksa imenovanega osteoid, ki ga sestavlja mešanica proteinov, izmed katerih večinski delež predstavlja kolagen tipa I. Osteoid z vezavo s hidroksiapatitom povzroči mineralizacijo kosti in ji da trdnost in rigidnost. Skozi proces osteogeneze se osteoblasti ujamejo v osteoid in se po mineralizaciji preoblikujejo v osteocite. Osteoklasti so celice, ki sodelujejo v resorpciji kosti, nahajajo se na kostni površini v prostorih, imenovanih Howshipove lakune (4, 5).

Kosti se po smrti organizma zaradi svojih lastnosti ohranijo mnogo bolje kot mehka tkiva. Slednja so na makrostrukturni ravni fizično bolj dostopna mikroorganizmom in drugim okoljskim dejavnikom, zaradi česar je njihov razkroj hitrejši, nasprotno pa so kosti fizično bolj odporne in se zato bolje ohranijo (1, 4, 11). Pri tem je zelo pomembna poroznost, ki pogojuje, kako hitro in na kakšen način bodo okoljski dejavniki vplivali na spremembe v kosteh po smrti. Velikost por v kostnem tkivu in njihova medsebojna povezanost določata, kako bodo vanj in iz njega prehajali voda, mikroorganizmi in drugi delci (11). Propad kostnih celic in mehkih tkiv v žilah naredi kost bolj porozno. Velik vpliv na razgradnjo ima okolje, v katerem se tkivo nahaja od smrti do najdbe, in v njem prisotni dejavniki; zaradi večanja poroznosti s časom lahko v prsti prisotne glive in bakterije ter v vodi prisotne cianobakterije lažje vdirajo v tkivo in ga delajo še bolj poroznega in zmanjšajo njegovo možnost preživetja (4). Nasprotno lahko pod okoljskimi vplivi pride do zmanjšanja poroznosti zaradi permineralizacije, ki postopoma vodi v fosilizacijo, zaradi česar se kost bolje ohrani (11).

Mehanizmi procesa razgradnje, načina in lokacije ohranjanja DNA v takem tkivu še niso v celoti raziskani. Na ultrastrukturni ravni naj bi na upočasnjeno razgradnjo molekule DNA in zaščito pred encimskimi procesi v skeletnih ostankih vplivala vezava njenih negativno nabitih fosfatnih skupin na hidroksilne skupine hidroksiapatita, čemur priča dejstvo, da se ob povečani razgradnji hidroksiapatita ohrani manj DNA, prav tako pa naj bi se molekula DNA vezala na kolagen - izolacija iz kostnega prahu je zato možna iz hidroksiapatitne in kolagenske frakcije (4, 7, 9). Kolagen in hidroksiapatit skupaj tvorita tesno strukturo, ki zaradi majhnih por onemogoča vdor kolagenazam mikroorganizmov (21).

Na **Sliki 2** je prikazana sestava spongiozne kostnine s trabekulami, lamelami, lakunami, osteociti, osteoklasti, osteoblasti, kanalikuli.



Slika 2: Sestava spongiozne kostnine. Slika povzeta po (32).

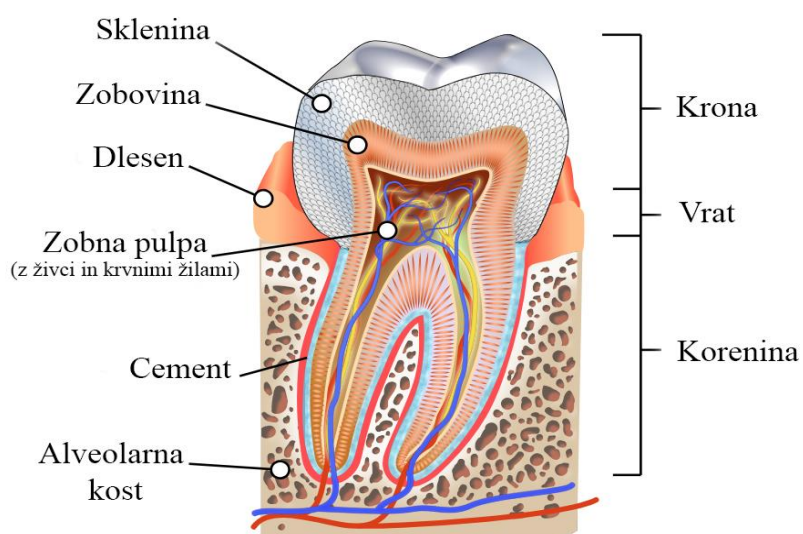
Ohranjenost in količina DNA vedno ne sovpadata z makroskopskim stanjem kosti, saj se lahko ta zdi v morfološko slabem stanju, a je iz nje v nekaterih primerih vseeno možno izolirati zadostno količino dobro ohranjene DNA. Nasprotno nam stanje na mikroskopski ravni pove mnogo več o ohranjenosti in količini DNA. Raziskava strukture srednjeveških človeških kosti s transmisijsko elektronsko mikroskopijo in imunohistokemijskimi metodami ter vsebnosti in ohranjenosti DNA v teh kosteh je pokazala povezavo med strukturo in vsebnostjo ter ohranjenostjo DNA. Dobro ohranjena DNA se nahaja v agregatih kristalov, povezana je z zelo dobro ohranjeno mikrostrukturo z malo demineralizacije, ohranjenimi lamelami, visoko vsebnostjo kolagena in bolj kompaktnim izgledom pri transmisijski elektronski mikroskopiji, kjer so vidni intaktni osteoni in dobro organiziran kostni matriks z vsebnostjo kolagena in osteokalcina (9).

Zobje

Anatomsko lahko zob razdelimo na tri dele; krona, ki predstavlja zgornji del in korenina, ki predstavlja spodnji, z alveolarno kostjo obdan del, ter vrat, ki predstavlja stičišče krone in korenine. Zunanja plast krone je prekrita s sklenino, ki je najtrše tkivo v človeškem telesu in je skoraj v celoti mineralnega izvora in ne vsebuje celic. Korenina zoba je prekrita s cementom, ki je mineralizirano tkivo, sestavljeno iz hidroksiapatita, kolagena in drugih

nekolagenskih proteinov. Delimo ga v dve vrsti glede na prisotnost ali odsotnost celic (cementocitov) (8). Cement brez celic se nahaja v vratnem delu zobne korenine in povezuje zob z obzobnimi tkivi. Cement, ki vsebuje v medceličnino ujete celice, se nahaja v apikalnem delu zobne korenine in v furkacijskem področju zoba - tam, kjer se razhajajo korenine večkoreninskih zob (24). Lahko ga primerjamo s kostnim tkivom, kjer so v lakunah ujete osteociti, saj prav tako služi kot dober vir DNA, a je po svoji funkciji in strukturi drugačen; ni ožiljen, oživčen, ne vsebuje kostnega mozga, ni podvržen nenehni remodelaciji, skozi življenje posameznika pa se nenehno debeli (8, 24). Na meji med krono in korenino - v področju imenovanem zobni vrat - se stikata sklenina in cement, pod njima pa se nahaja zobovina, ki ščiti zobno pulpo. Zobovina in pulpa predstavljata glavnino zoba in sta v nasprotju s sklenino bogata s celicami, večinoma gre za odontoblaste in fibroblaste. Zobovino sestavljajo hidroksiapatit, kolagen tipa I in voda (8).

Na **Sliki 3** je prikazan vzdolžni prerez zoba, njegovi deli (krona, vrat, korenina, pulpa) in tkivna sestava (sklenina, zobovina, cement) ter vzdolžni prerez dlesni in alveolarne kosti, ki obdajata zob.



Slika 3: Vzdolžni prerez in sestava zoba z dlesnijo in alveolarno kostjo. Slika povzeta po (30).

S starostjo posameznika se sestava zoba spreminja, s tem pa se spreminja tudi količina in razporeditev DNA. Vzroki za to so mineralizacija in naravna izguba sklenine ter zmanjšanje poroznosti zobovine, prav tako se z leti število celic v pulpi zmanjša in postane bolj fibrozna, zmanjša se tudi njen volumen zaradi nenehnega nalaganja zobovine. Pulpa je

dobro ožiljena in oživčena in predstavlja bogat vir DNA, vendar je lahko prisotna v omejeni količini ali je celo ni pri starejših ali umrlih zobeh, medtem ko zobna korenina vsebuje približno desetkrat več DNA kot krona, saj slednjo večinoma sestavlja brezcelična zobna sklenina. Če sklenino uporabimo pri vzorčenju v kombinaciji z ostalimi zobnimi tkivi, lahko prisotnost mineralov moti ekstrakcijo in inhibira pomnoževanje PCR. Zobje z večjo pulpo in zobje z več koreninami so najboljši vir DNA, saj vsebujejo več celic pulpe, prav tako pa imajo več zobnega cementa v primerjavi z zobmi z eno korenino. Po priporočilih so najprimernejši kočniki, če slednjih ni, se za uporabo priporočajo ličniki (8).

Po smrti posameznika so zobje podvrženi v veliki meri enakim dejavnikom kot kosti, a so na te dejavnike bolj odporni in zato primernejša izbira za genetsko identifikacijo, saj so boljše zaščiteni tako zaradi zgradbe tkiv kot tudi zaradi pozicije v čeljusti, kar predstavlja dodatno obrambo pred okoljskimi vplivi in fizičnimi poškodbami, ki bi lahko pospešili propad tkiv. Najugodnejši medij, v katerem se zobje lahko nahajajo od smrti posameznika do najdbe, je zrak, nekoliko slabše rezultate dajejo zobje, ki so bili zakopani v zemljo, najslabše pa zobje, ki so bili v vodi (8).

Zobna tkiva se razgrajujejo počasi tudi v ekstremnih okoljih, odporna so na ekstremne temperature in manj dovzetna za hidrolizo (7). Zunanje tkivo, sklenina, ščiti tkiva, ki so v notranjosti zoba, pred zunanjimi dejavniki, kot so denimo UV sevanje, mikroorganizmi in višje temperature. Sklenina ima pore in je neprepustna za molekule, ki so večje od vode, ter tako ščiti zob tudi po smrti organizma. S pomočjo radiometričnega datiranja ogljikovega izotopa v sklenini je možno določiti letnico rojstva posameznika, ki mu pripada zob, včasih pa tudi letnico smrti, saj tkivo ni podvrženo nenehni remodelaciji in je radiometrično datiranje zato mnogo bolj natančno. Pore v zobovini prav tako prispevajo k boljši ohranjenosti, saj so manjše od por v kostnem tkivu, tubuli v zobovini med seboj niso povezani, prav tako ni povezave z zunanjo površino zoba preko Harvesovih kanalov, kot pri kosteh - vse to prispeva k boljši izolaciji in ohranjenosti zob v primerjavi s kostmi. Hkrati so, podobno kot pri kosteh, tudi zobje zaščiteni s pomočjo kolagena. Mineralizirani kolagen je mnogo odpornejši od nemineraliziranega in se zato ob odsotnosti encimske razgradnje lahko v kosteh ohranja več sto ali celo več tisoč let (21). Voda, pH in poroznost mineraliziranega tkiva so dejavniki, ki vplivajo na topnost hidroksiapatita; voda omogoči raztapljanje mineralnih ionov, prav tako se topnost viša z nižanjem pH. Izmenično suha in vlažna okolja in okolja z nenehnim vodnim pretokom so bolj škodljiva, kot nenehno vlažna

okolja (8, 11, 21). Potrebno je upoštevati tudi, ali je zob po smrti izpadel ali ne, saj alveolarna kost pomaga zmanjšati možnost kontaminacije (8).

V zobeh se DNA s časom razgrajuje, na kar, podobno kot pri kosteh, v veliki meri vplivajo vsi že prej omenjeni okoljski dejavniki. Rubio s sodelavci s preiskovanjem vpliva časa od smrti posameznika na DNA ugotavlja, da največ DNA v zobnih tkivih propade v prvih dveh letih po smrti, nato pa v intervalu med 2 in 10 let po smrti ni opaznega znižanja količine DNA - vsi zobje so bili hranjeni na sobni temperaturi (27). Razkroj se prične z endogenimi encimi, ki se sprostijo iz notranjosti celic po njihovi smrti, nadaljuje pa z eksogenimi encimi, ki izvirajo iz organizmov v okolju ali pa jih proizvajajo mikroorganizmi, ki vdirajo v zobno tkivo. Proces razgradnje DNA najbolj pospešijo eksogeni encimi, medtem ko imajo endogeni encimi, hidroliza in oksidacija manjši vpliv (8). Garcia s sodelavci s preučevanjem vplivov časa in različnih okolij, kot so pesek, zemlja, sladka in slana voda ter zrak na količino DNA v zobeh ugotavlja, da ima najugodnejši vpliv na ohranjanje DNA zrak, medtem ko ima voda najslabši vpliv (28).

Izpuljeni zobje, ki so jih Schwartz in sodelavci v namen ugotavljanja vpliva okoljskih dejavnikov na DNA v zobni pulpi izpostavili pogojem, kot so različne pH vrednosti (3, 7, 10), temperatura (4°C, 25°C, 37°C, sežig), vlaga (20%, 66%, 98%), vrste prsti (pesek, zemlja za rože, vrtna zemlja), morska voda, sobna temperatura 16 do 19 let in pokop od enega tedna do šestih mesecev, so pokazali, da razen prsti, ostali dejavniki niso bistveno vplivali na zmožnost pridobitve DNA iz zobne pulpe (22). Suho okolje in nižja temperatura v kombinaciji s kratkim časom od smrti posameznika so za ohranitev DNA v pulpi najugodnejši, v nasprotnem primeru pa ohranitev DNA odvisi od trdnih zobnih tkiv (8).

Na količino in kvaliteto DNA v zobu vplivajo tudi bolezni zob, hkrati pa slednje zvišajo možnosti kontaminacije. Pri kariesu mikroorganizmi lokalno razgradijo mineralizirano zobno tkivo, kar omogoči vdor bakterij v pulpo in pod njihovim vplivom privede do smrti celic, zato posledično zobna pulpa hitro začne s proizvajanjem in odlaganjem terciarne, strukturno slabše organizirane zobovine, v kateri so odontoblasti lahko ujeti v mineralizirano zobno tkivo. V kombinaciji z napredovano parodontalno boleznijo lahko karies uniči zobni cement, saj je le-ta v tem primeru izpostavljen ustni votlini in tako dostopen mikroorganizmom (8). Napredovana parodontalna bolezen, karies in njuno

zdravljenje vplivajo na viabilnost celic v zobnih tkivih, posledično pa tudi na DNA. Higgins in sodelavci s preučevanjem zobovine in zobnega cementa, kot dveh morebitnih najugodnejših virov jedrne DNA v zobeh, ki so pripadali moškim in ženskam med 17 in 79 let, prihajajo do zaključkov, da obstaja razlika v količini jedrne DNA na miligram tkiva med primerljivimi zobmi iste osebe in med različnimi tkivi istega zoba. Ugotavljajo, da starost in boleznj zob vplivajo na količino DNA v zobovini, ne pa tudi v zobnem cementu. Pri vzorčenju priporočajo uporabno zdravih, nezdravljenih zob, če takih ni na voljo, pa je DNA bolj smiselno pridobiti iz zobnega cementa. Ravno nasprotno pa glede na njihove raziskave vpliva na količino DNA spol, kjer njihova statistična analiza kaže, da obstaja razlika v količini DNA v zobnem cementu, z večjo povprečno količino pri moških, medtem v zobovini razlike v količini DNA med spoloma ni bilo opaziti (23).

RAZISKAVE O UPORABNOSTI RAZLIČNIH SKELETNIH ELEMENTOV V NAMEN IZOLACIJE DNA IN GENOTIPIZACIJE

Najprimernejše za izolacijo in analizo DNA iz kosti so po trenutnih priporočilih kompaktne kosti, predvsem dolge kosti rok in nog. Izmed teh je kot najbolj primerna označena stegnenica, takoj za njo golenica in nadlahtnica, ponekod tudi mečnica, manj primerne pa so ploščate in spongiozne kosti, kot so kosti lobanje, vretenca in rebra (6, 12, 13, 15). Podobno Edson in sodelavci kot najprimernejše označujejo dolge, kompaktne kosti nog (stegnenica in golenica), dobre rezultate v njihovi raziskavi dajejo tudi stopalnice in rebra, medtem ko ugotavljajo, da so za dobro genotipizacijo manj primerne kosti glave, kar pripisujejo njihovi poroznosti, zaradi česar je take kosti težko očistiti z brušenjem. V splošnem poudarjajo, da so za vzorčenje najprimernejši predeli kompaktne kostnine (86). Po aktualnih priporočilih Interpola (87), kot tudi glede na zaključke raziskave Prinza in sodelavcev (83) je najbolj smiselno vzorčiti dolge, kompaktne kosti nog in rebra, če slednji elementi niso na voljo, pa za vzorčenje priporočajo zobe; spongiozno kostnino označujejo kot dober morebiten vir DNA, a je v svoja priporočila ne uvrščajo, zaradi slabše možnosti ohranjanja tovrstnega tkiva (83, 87). Ameriško združenje National Association of Medical Examiners enako kot Interpol v svojih aktualnih priporočilih kot prvo izbiro označuje (dolge) kompaktne kosti, takoj za njimi pa zobe (88). S slednjimi priporočili sovpadajo tudi priporočila ameriškega nacionalnega inštituta National Institute of Justice (89). Mundorff in sodelavci (90) pa v študiji iz leta 2009 nekoliko odstopajo od podobnih raziskav in dokazujejo, da dolge, kompaktne kosti morda niso (edina) najboljša izbira za

analizo DNA in ugotavljajo, da so rezultati analiz pogačic, stopalnic in prstnic nog primerljivi ali celo boljši od stegenic in golenic, vsem naštetim pa po kvaliteti rezultatov sledijo rebra. Najslabše rezultate so pridobili iz križnic, prstnic rok, lopatic, ključnic, nartnic, kosti lobanje in dlančnic (90). Novejša študija raziskovalcev Mundorff in Davorena temu podobno kaže, da dolge kompaktne kosti morda niso (edina) najboljša izbira za analizo DNA, vendar pa poleg potrditve rezultatov predhodne raziskave (90) tokrat med najboljše uvrščata tudi prstnice rok; dokazujeta, da je količina jedrne DNA na enoto mase kosti mnogo višja pri majhnih spongioznih kosteh, ki se do sedaj običajno niso vzorčile in uporabljale v te namene, v primerjavi s kompaktnimi. Najboljše rezultate dajejo majhne spongiozne kosti rok in nog - prstnice rok in nog, stopalnice in pogačice (16). Potrditev temu so tudi nekatere druge raziskave, ki govorijo o zelo uspešnih analizah DNA, pridobljene iz tovrstnih kosti, in celo priporočajo uporabo prstnic kot nadomestek za stegenico zaradi lažjega vzorčenja in dobrih rezultatov (17 - 20).

Vzroki za večjo količino in bolj ohranjeno DNA v tej vrsti kostnine še niso znani. V naslednji študiji Mundorff in Davoren s sodelavci (17) preko raziskave mikrostrukture kostnine ugotavljata, da kljub višjemu številu osteocitnih lakun v kompaktni kostnini ni povezave s količino DNA na enoto mase vzorca, so pa s pomočjo sinhrotrone radiacijske mikro računalniške tomografije (Synchrotron Radiation Micro-Computed Tomography, SR micro-CT) opazili ostanke prostemu očesu nevidnih mehkih tkiv med trabekulami spongiozne kostnine in postavili hipotezo, da bi naj ostanki mehkih tkiv vsebovali celice kostnega mozga, pokostnice in endosteuma, kar naj bi vplivalo na večjo količino DNA v spongiozni kostnini (17).

Prav tako v nasprotju z uveljavljenimi priporočili najnovejše raziskave kažejo, da je za genetske preiskave skeletiziranih posmrtnih ostankov najprimerneje vzorčiti dva elementa in sicer zobni cement v predelu korenine (24), še več raziskav (26) pa se osredotoča in različne skeletne elemente primerja s srednjim delom senčnice - skalnico, ki je ena izmed najtrših kosti v človeškem telesu (25).

Gamba s sodelavci (29) s primerjavo količine DNA v skalnicah in zobeh sedmih posameznikov prihaja do zaključka, da je količina endogene DNA v skalnici v povprečju 5,2-krat večja od tiste v zobeh, vendar pa pri slednjih niso vzorčili le zobnega cementa (29).

Medtem Hansen in sodelavci (25) s preiskavo obeh elementov (zobni cement in skalnica), pridobljenih iz istega skeleta, ki se med seboj razlikujejo po starosti in okolju, v katerem so se po smrti nahajali, ugotavljajo, da lahko dobro ohranjen zobni cement vsebuje enako ali celo večjo količino DNA kot skalnica, vendar pa ob slabi ohranjenosti zob (krhki zobje, brez cementa) priporočajo uporabo skalnice. Slednja je po njihovih raziskavah v slabših ohranitvenih pogojih odpornejša oziroma boljše zaščitena v primerjavi z zobnim cementom, zato se DNA v njej ohrani dlje (25).

Do podobnih ugotovitev prihajajo Pilli in sodelavci, ki s primerjavo skalnic, stegnenic in zob posameznega skeleta, skupno trinajst skeletov iz 6. do 7. stoletja (39 elementov) dokazujejo, da se DNA v skalnici ohrani boljše tudi v primerjavi s stegnenico in zobmi in je iz nje možno pridobiti celotne STR - profile tudi pri zelo starih kosteh. Sklepajo, da je vzrok temu visoka gostota kostnine v skalnici, kar zviša odpornost in zmanjša poškodbe in razkroj DNA, ki bi ga povzročile bakterije po smrti organizma (26).

DEDOVANJE DNA

Avtosomska DNA posameznika je rezultat dedovanja od obeh staršev, izmed katerih se od vsakega podeduje polovica – s posameznim staršem si torej otrok deli polovico avtosomske DNA. Nekoliko drugače se dedujeta mitohondrijska DNA (mtDNA) in kromosom Y; mtDNA se deduje po materi ne glede na spol otroka, medtem ko se kromosom Y deduje po očetu in se prenaša zgolj na moške potomce. Zaradi enostarševskega dedovanja mtDNA in kromosoma Y ne prihaja do rekombinacije, razen v kratkem, terminalnem predelu kromosoma Y, ki se rekombinira s kromosomom X. Z analizo mtDNA lahko torej sledimo maternalni (materini) liniji ne glede na spol, medtem ko z analizo kromosoma Y lahko sledimo paternalni (očetovi) liniji (85).

AVTOSOMSKA JEDRNA DNA IN KRATKI POLIMORFNI ODSEKI V FORENZIČNIH MOLEKULARNO GENETSKIH PREISKAVAH

Genetski profil (DNA – profil ali STR – profil) sestavlja niz števil, ki predstavljajo posamezne alele preiskovane osebe oziroma vzorca. Te številke predstavljajo število ponovitev osnovnega motiva posameznega lokusa STR in so torej povezane z dolžinskim polimorfizmom lokusov STR. Fragmenti DNA lokusov STR so različno dolgi in nam omogočajo razlikovanje med genetskimi profili različnih oseb (34).

Zgolj približno 5% celotne molekule DNA so eksoni, tisti deli, ki predstavljajo zaporedja, ki kodirajo proteine. Preostanek molekule DNA so nekodirajoča področja, imenovana introni, katerih vloga kljub temu, da predstavljajo večinski del, še ni v celoti znana (34).

Tekom evolucijskih procesov so introni izpostavljeni nekoliko drugačnim procesom, kot eksoni; mutacije se lahko pojavijo v tako kodirajočih kot tudi nekodirajočih predelih DNA, vendar pri slednjih niso nujno fenotipsko izražene, a v njih vseeno povzročajo visoko stopnjo polimorfnosti, saj so mutacije tukaj manj nadzorovane kot v kodirajočih predelih. Tako najdemo denimo hipervariabilne lokuse, ki jih uporabljamo kot označevalce v namen identifikacije oseb, v nekodirajočih regijah, saj so zaradi visoke stopnje polimorfnosti ti predeli mnogo bolj individualno specifični (34).

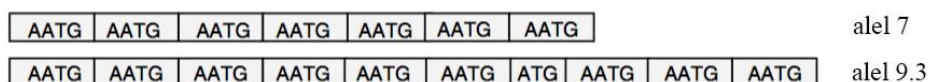
V človeškem genomu poznamo tri vrste takih polimorfizmov: minisateliti (VNTR, variabilno število tandemskih ponovitev), mikrosateliti (STR, kratke tandemске ponovitve) in polimorfizme posameznega nukleotida (SNP) (34).

Minisateliti so predeli DNA, ki sestojijo iz zaporednih ponavljajočih se homolognih enot (osnovnih motivov), izmed katerih je vsaka posamična dolga med 20 in 100 baznih parov in se zaporedno ponovi do 100 krat. Visoka stopnja polimorfnosti minisatelitnih lokusov je posledica različnega števila ponovitev enot oz. osnovnih motivov, zaradi česar so ti lokusi zelo uporabni kot identifikacijski označevalci (34).

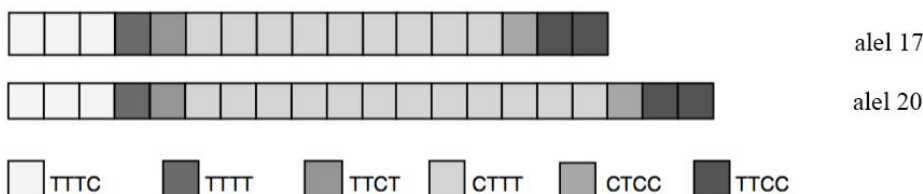
Mikrosateliti so po principu podobni minisatelitom, a se od slednjih razlikujejo v dolžini osnovnega motiva in v številu ponovitev le-tega. Posamične enote so dolžine 2-8 baznih parov, število njihovih ponovitev pa je 2-20. Ločimo tri vrste mikrosatelitov glede na vzorec ponavljanja osnovnih motivov: enostavne, sestavljene in kompleksne (glej Sliko 4). Enostavne sestavlja neprekinjen niz homolognih ponavljajočih se motivov, pri sestavljenih gre za dve ali več enostavnih sosednjih ponovitev, pri kompleksnih pa gre za več različno dolgih ponovitev z različno velikimi osnovnimi motivi, niz ponovitev pa je lahko vmes prekinjen (34).

Na **Sliki 4** so prikazana področja STR; TH01, FGA in D21S11 so trije lokusi STR, ki se pogosto uporabljajo v forenzičnih preiskavah. TH01 je lokus z enostavnimi ponovitvami, FGA vsebuje sestavljene ponovitve, D21S11 pa sestavljajo kompleksne ponovitve. Za vsak lokus sta prikazana dva alela.

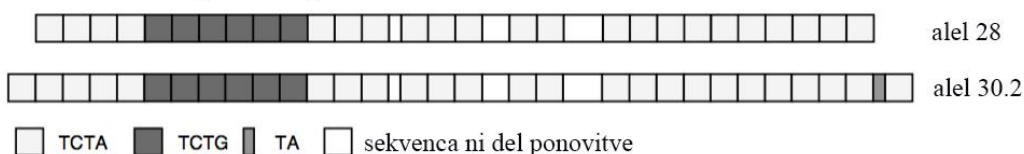
TH01 - Enostavna ponovitev



FGA - Sestavljena ponovitev



D21S11 - Kompleksna ponovitev



Slika 4: Vzorci enostavne, sestavljene in kompleksne ponovitve STR - področij. Slika povzeta po (35).

Tako pri mini kot tudi pri mikrosatelitih govorimo o dolžinskih polimorfizmih, ki jih je možno določiti s pomočjo standardnih elektroforetskih metod (34).

Pri polimorfizmih posameznega nukleotida (SNP) obstaja v genomu na točno določenih mestih več možnih različic baz - med aleli je torej razlika zgolj pri enem nukleotidu. Gre za najpogostejšo obliko polimorfizma v genomu, ki se pojavlja v bi, tri ali tetra alelni obliki (34).

STR - aleli (mikrosateliti) so zaradi svoje velikosti v kriminalistiki, kjer je DNA pogosto razgrajena (degradirana), najprimernejši za uporabo, saj je pomnoževanje DNA z reakcijo PCR uspešnejše, če pomnožujemo krajše odseke. Pri pomnoževanju daljših odsekov lahko pride tudi do izpada alela, saj se lahko pomnoži le njegov del. Prav tako je pri genotipizaciji možno doseči večjo resolucijo, če so fragmenti krajši (33).

V človeškem genomu obstaja na tisoče lokusov STR, primernih za forenzične analize, ki se nahajajo na vseh avtosomnih in obeh spolnih kromosomih. Kljub velikemu številu poznanih lokusov STR pa se jih običajno v forenzičnih analizah uporablja zgolj okrog 20 (35). Tako avtosomni kot tudi neavtosomni lokusi STR imajo visoko mutacijsko stopnjo v primerjavi z drugimi vrstami polimorfnihih lokusov, kar naj bi bila posledica tega, da se v

genomu nahajajo v regijah, ki so bolj podvržene mutacijam - t. i. mutacijske "vroče točke" (angl. "hot spots") (67). STR - označevalce v izogib možnim povezavam med njimi običajno izberemo na ločenih kromosomih (33).

STR - lokuse med seboj, glede na vrsto osnovnega motiva, ločimo na dinukleotidne, pri katerih gre za različno število ponovitev osnovnega motiva, sestavljenega iz dveh nukleotidov, trinukleotidne, kjer se ponavlja osnovni motiv, sestavljen iz treh, tetranukleotidne, kjer se ponavlja osnovni motiv, sestavljen iz štirih baz itn. V namen identifikacije oseb se najpogosteje uporabljajo STR - lokusi, ki jih sestavljajo tetranukleotidni osnovni motivi (33).

Človeški genom vsebuje mnogo STR - lokusov, na vsakem izmed lokusov pa je več različnih alelov, kar omogoča razlikovanje med posamezniki in njihovo identifikacijo. Vendar pa na vsakem STR - lokusu obstaja le omejeno število alelov, zato je v molekularnogenetskih sodnomedicinskih preiskavah potrebno analizirati več lokusov hkrati, da je s pomočjo njihove kombinacije možna natančna identifikacija in razlikovanje med posamezniki (34).

Za hkratno analizo več STR - lokusov morajo slednji zadoščati naslednjim pogojem:

- ločeni in med seboj prepoznavno različni aleli,
- pomnoževanje lokusa mora biti robustno,
- močan diskriminacijski potencial,
- preiskovani lokusi med seboj ne smejo biti genetsko povezani,
- nizka tvorba artefaktov ob pomnoževanju lokusa v reakciji PCR,
- možnost pomnoževanja s hkratno reakcijo PCR (35).

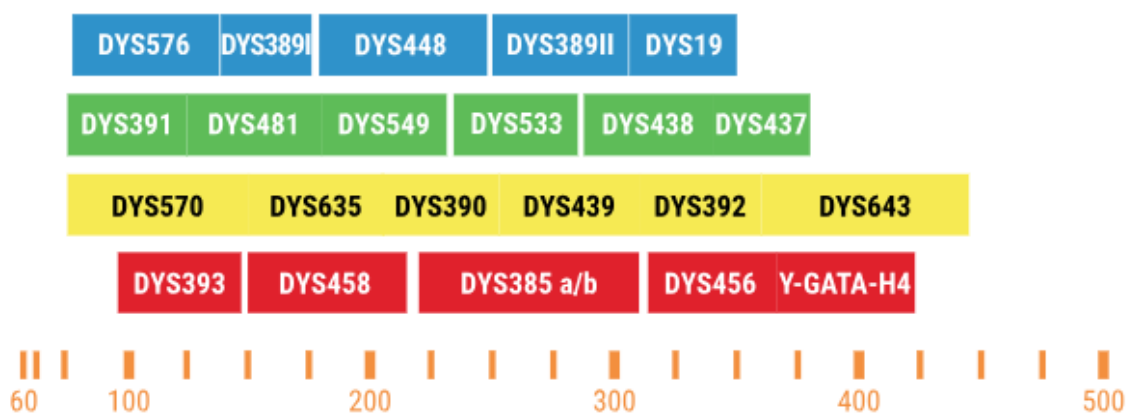
Pomembno je, da v kriminalistiki uporabljeni STR – označevalci, pridobljeni iz biološkega materiala, v analizah dajejo popolnoma enake profile ne glede na posameznika ali laboratorij, ki izvaja analizo, saj je le tako možna medlaboratorijska primerjava in razvoj podatkovnih zbirk (68-72).

Poleg STR - lokusov se pri identifikaciji oseb kot označevalec uporablja tudi amelogeninski lokus, prisoten na kromosomih X in Y, na katerem se nahaja gen za amelogenin, ki kodira protein, ki sestavlja matriks sklenine. Obstajata dve različici gena;

gre za dolžinski polimorfizem - tista različica, ki jo najdemo na kromosomu X (107 baznih parov), je v primerjavi s tisto na kromosomu Y (113 baznih parov) za šest baznih parov krajša, zato dobimo po reakciji produkte PCR, specifične za posamezni kromosom. Pri pomnoževanju ženske DNA dobimo produkta istih dolžin, pri pomnoževanju moške DNA pa produkta različnih dolžin (73).

Potrebno je natančno določanje dolžine STR - alelov, saj se lahko med seboj razlikujejo zgolj za en bazni par. Zaradi podobne dolžine STR - lokusov lahko ob njihovi hkratni analizi prihaja pri rezultatih genotipizacije do prekrivanja lokusov, kar onemogoči ali delno onemogoči interpretacijo zaradi nezmožnosti ločevanja med sicer različnimi, a dolžinsko podobnimi ali enako dolgimi lokusi, zato je pri pomnoževanju z reakcijo PCR potrebno produkte označiti s fluorescentnimi barvili, da lahko alele, ki smo jih tipizirali, ločimo in pripišemo pripadajočim lokusom (35). Za označevanje produktov PCR najnovejši kompleti, kot je denimo GlobalFiler™ Kit (Thermo Fisher Scientific), uporabljajo do šest različnih barvil, kar omogoča analizo do pet lokusov STR podobne dolžine, eno izmed barvil pa je namenjeno označevanju notranjega velikostnega standarda (14).

Na **Sliki 5** je prikazan komplet za pomnoževanje lokusov STR. Prikazani so lokusi, njihove velikosti, barvni označevalci in notranji velikostni standardi.



Slika 5: PowerPlex® Y23 System. Slika povzeta po (91).

NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

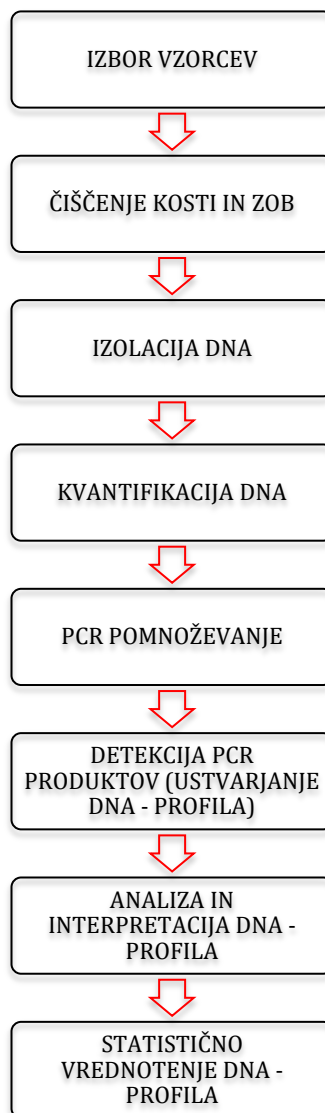
Zobje in dolge kosti, predvsem stegenice, so po veljavnih priporočilih najprimernejši vzorci za genetsko identifikacijo skeletnih posmrtnih ostankov v forenzičnih analizah, vendar pa raziskovalca Mundorff in Davoren v njihovi najnovejši študiji (16), opravljeni na relativno svežih skeletih, kot primernejše označujeta drobne kosti končnih delov udov (dlančnice, stopalnice in kosti členkov prstov - prstnice). V magistrski nalogi bomo ugotovili, ali so tudi pri starejših skeletnih elementih za genetsko identifikacijo primernejši drugi elementi kot zobje in stegenice. Obdelali bomo 56 skeletnih elementov pri vsakem izmed treh kompletnih moških skeletov iz slovenskega množičnega grobišča Huda jama iz časa druge svetovne vojne, skupno 168 elementov. Vzorčili bomo skeletne elemente glave, trupa, rok in nog. Pri vsakem skeletu bomo vzorčili le kosti iz desne strani telesa. Iz vseh teh elementov bomo izolirali DNA, jo kvantificirali, tipizirali in določili genetske profile s pomočjo avtosomskih STR - lokusov. Genetske profile bomo ovrednotili glede na količino izolirane DNA, število uspešno pomnoženih STR - lokusov in nato določili približno 20 skeletnih elementov, ki so najprimernejši za genetsko identifikacijo posameznikov iz obdobja druge svetovne vojne. Izbrane elemente bomo primerjali s tistimi, ki jih raziskovalca Mundorff in Davoren določata kot najprimernejše za genetsko identifikacijo skeletov in poiskali morebitne razlike med primernostjo izbora določenih elementov novejših skeletov v primerjavi s 70 let starimi skeleti. Na koncu bomo s pomočjo različnih skeletnih elementov genetsko identificirali 7 skeletov, izkopanih iz grobišča Babna Gora.

Magistrska naloga je del projekta ARRS J3-8214, katerega nosilec je znanstvena svetnica in doc. dr. Irena Zupanič Pajnič, univ. dipl. biol., iz Inštituta za sodno medicino, Medicinske fakultete UL.

Komisija za medicinsko etiko je podala soglasje za izvedbo raziskave skeletov iz grobišča Huda jama (št. odločbe 102/11/14) in identifikacijo žrtev iz grobišč Babna Gora ženski grob (št. odločbe 0120-35/2015-3, KME 118/05/15) ter moški grob (št. odločbe 0120-638/2016-4, KME 59/01/17).

MATERIALI IN METODE

SHEMATSKI PRIKAZ POTEKA DELA



VZORCI

Skeleti iz grobišča Huda jama

Za iskanje najprimernejših skeletnih elementov za identifikacijo žrtev druge svetovne vojne smo izbrali tri moške skelete, izkopane iz povojnega grobišča Huda jama, ki smo jih označili s črkami A, B in C. Za izolacijo genomske DNA smo vzorčili 56 skeletnih elementov desne strani telesa vsakega izmed treh moških skeletov, skupno 168 skeletnih elementov. Vzorčili smo sledeče skeletne elemente:

Skeletni elementi glave:

- čelnica,
- temenica,
- zatilnica,
- senčnica,
- spodnja čeljustnica,
- zgornja čeljustnica,
- zgornji sekalec,
- spodnji sekalec,
- zgornji podočnik,
- spodnji podočnik,
- zgornji ličnik,
- spodnji ličnik,
- zgornji kočnik,
- spodnji kočnik.

Skeletni elementi

trupa:

- prsno vretence,
- ledveno vretence,
- vratno vretence,
- rebro I.,
- rebro VI.,

- rebro XII.,
- prsnica,
- kjučnica,
- lopatica,
- sednica,
- črevnica,
- sramnica,
- križnica.

Skeletni elementi rok:

- nadlahtnica,
- podlahtnica,
- koželjnica,
- dlančnica I.,
- dlančnica II.,
- dlančnica III.,
- dlančnica IV.,
- dlančnica V.,
- proksimalna prstnica palca roke,
- distalna prstnica palca roke,
- glavatica.

Skeletni elementi nog:

- stegnenica,
- golenica,
- mečnica,
- pogačica,
- stopalnica I.,
- stopalnica II.,
- stopalnica III.,
- stopalnica IV.,
- stopalnica V.,
- proksimalna prstnica palca noge,
- distalna prstnica palca noge,
- klinasta kost intermedialno,
- klinasta kost medialno,
- klinasta kost laterlano,
- petnica,
- skočnica,
- čolnič,
- kocka.

Skeleti iz grobišča Babna Gora

Za identifikacijo žrtev medvojne grobišča Babna Gora v ženskem grobu smo uporabili stegnenice, golenice in spodnji levi kočnik. Za identifikacijo žrtev v moškem grobu smo

uporabili stegenice. Kot referenčne vzorce smo uporabili profila DNA dveh še živečih sorodnikov, ki smo jih pridobili z izolacijo DNA iz brisov ustne sluznice.

Eliminacijska zbirka genetskih profilov

V eliminacijsko zbirko smo vključili vse osebe, ki so sodelovale v postopku od izkopa in nadalje pri obdelavi vzorcev kosti in zob (izolaciji, kvantifikaciji in tipizaciji DNA). Njihove profile smo pridobili z izolacijo DNA iz brisov ustne sluznice.

PREPREČEVANE KONTAMINACIJE

Izvor kontaminacije kosti in zob je lahko DNA bakterij in gliv, ki lahko vpliva na uspešnost pridobitve endogene DNA iz vzorcev in je ni možno preprečiti, medtem ko je kontaminacijo endogene DNA z moderno človeško DNA, do katere lahko pride med izkopom, nepravilnim shranjevanjem, antropološkimi in genetskimi preiskavami, možno preprečiti s pravilnim ravnanjem z vzorci (37). Do tovrstne kontaminacije lahko pride zaradi nepravilnega postopanja z vzorci brez uporabe zaščitnih sredstev (rokavic, kirurških mask, zaščitnih prevlek za čevlje, zaščitnih čepic, zaščitnih plaščev), lahko pa je kontaminacija posledica prisotnosti eksogene DNA v reagentih, na materialih ali v zraku, kjer je DNA vezana na aerosole (38). Za prepoznavanje morebitnega izvora kontaminacije je pomembno, da vzpostavimo eliminacijsko zbirko genetskih profilov vseh oseb, ki so rokovale z vzorci vse od izkopa in skozi nadaljnje analize, da lahko potrdimo pravilnost oziroma avtentičnost genetskih profilov, pridobljenih iz preučevanih vzorcev. Poleg tega je pomembno tudi, da hkrati z vsako serijo vzorcev analiziramo tudi negativno kontrolo, slednjo pa je potrebno vključiti tudi v vsako PCR - reakcijo, da preverimo in identificiramo morebitni vzrok kontaminacije katerega izmed predhodno uporabljenih reagentov in materialov (39).

V Laboratoriju za molekularno genetiko Inštituta za sodno medicino v Ljubljani smo v izogib kontaminaciji vedno sledili naslednjim priporočilom:

- uporabljamo dvojne čiste, sterilne laboratorijske rokavice, ki jih za vsak vzorec menjamo, kirurške maske za obraz, zaščitne kape, zaščitne prevleke za čevlje in zaščitno haljo za enkratno uporabo,

- vse delovne površine pred in po delu ter med vsako novo serijo očistimo s 6% natrijevim hipokloritom, bidestilirano vodo in 80% etanolom, če je možno jih čez noč izpostavimo tudi UV sevanju,
- orodja in pripomočke za čiščenje, brušenje in mletje kosti in zob po uporabi očistimo na enak način, kot delovne površine, jih steriliziramo in čez noč ter pred začetkom dela izpostavimo UV sevanju,
- na enak način po sterilizaciji čez noč in pred začetkom dela UV sevanju izpostavimo vse pripomočke, orodja, reagente in laboratorijsko plastiko,
- za vsak vzorec uporabimo nova, čista orodja in pripomočke,
- referenčne vzorce in vzorce, ki sestavljajo eliminacijsko zbirko analiziramo popolnoma ločeno od vzorcev kosti in zob,
- prostorsko med seboj ločimo različne dele analize, da preprečimo morebitno kontaminacijo s predhodno pomnoženimi produkti PCR. Pomnoženih PCR - produktov nikoli ne vnašamo v prostore za pripravo vzorcev in reagentov, izolacijo DNA in pripravo reakcij PCR; slednji so med seboj prav tako ločeni,
- čiščenje in mletje kosti in zob poteka v popolnoma ločenem prostoru, kjer mehansko čistimo vzorce kosti v zaprti citostatični komori, da preprečimo navzkrižno kontaminacijo vzorcev s kostnim prahom. Ta prostor uporabljamo zgolj za pripravo tovrstnih vzorcev (kosti in zob), ne pa tudi za pripravo vzorcev, ki vsebujejo večje količine DNA, kot denimo vzorci krvi in slin,
- v pomnoževanje produktov z reakcijo PCR vedno vključimo negativno PCR - kontrolo, da zaznamo kakršnokoli kontaminacijo z DNA ali predhodno pomnoženimi PCR - produkti,
- prav tako vedno vključimo negativno kontrolo v postopek izolacije DNA, da preverimo čistost izolacijskih reagentov, laboratorijske plastike in morebitno navzkrižno kontaminacijo vzorcev,
- uporabljeni nastavki za pipete morajo imeti filtre, da preprečimo kontaminacijo z DNA, vezano na aerosole, in biti pred uporabo izpostavljeni UV svetlobi, za vsak vzorec pa moramo uporabiti nov nastavek, da preprečimo možnost navzkrižne kontaminacije,
- dobljene profile skeletnih elementov primerjamo z eliminacijsko podatkovno zbirko genetskih profilov,

- analizo DNA iz kosti in zob v primeru identifikacije delamo za vsakega posameznika v dvojniku, najraje iz različnih skeletnih elementov - tako preverimo, ali dobljeni rezultati med seboj sovpadajo (36).

IZOLACIJA DNA (priprava reagentov in vzorcev, ekstrakcija in čiščenje DNA)

Pri izolaciji DNA je potrebno paziti, da se izognemo izpostavitvi vzorcev visokim temperaturam, močnim detergentom ali obdelavi z drugimi agresivnimi postopki, saj tako preprečimo nadaljnjo razgradnjo starodavne DNA (40). Metoda mora prav tako čim boljše zmanjšati število inhibitorjev in omogočiti pridobitev čim večje količine DNA, ki je na voljo v vzorcu (41).

Izolacija DNA iz skeletnih elementov poteka v več fazah, ki obsegajo čiščenje, mletje in demineralizacijo kosti in zob ter ekstrakcijo in čiščenje DNA.

Reagenti, ki smo jih uporabili pri izolaciji DNA in njihova priprava:

Vsi reagenti so bili pripravljani z ultra čisto destilirano vodo (Gibco), ki je bila predhodno čez noč izpostavljena UV sevanju. Po pripravi in pred vsako nadaljnjo uporabo smo vse reagente, materiale in opremo čez noč izpostavili UV sevanju.

- 1. 5 % Alconox detergent** (25 g prahu detergenta Alconox (Sigma-Aldrich) smo dodali 500 mL ultra čiste destilirane vode (Gibco); steklenico smo položili v vročo vodo, da se je detergent raztopil; čez noč smo izpostavili UV sevanju),
- 2. 80 % etanol** (400 mL absolutnega etanola (Merck) smo dodali 100 mL ultra čiste destilirane vode (Gibco); čez noč smo izpostavili UV sevanju),
- 3. 0,5 M EDTA** (46,53 g prahu EDTA (Promega), dopolnili do 200 mL z ultra čisto destilirano vodo (Gibco) in pH uravnali na 8,0 s 5 M NaOH, končni volumen raztopine je bil 250 mL, razliko smo dopolnili z ultra čisto destilirano vodo (Gibco); raztopino smo avtoklavirali in čez noč izpostavili UV sevanju),
- 4. 5 M NaOH** (20 g prahu NaOH (Merck) smo dopolnili do 100 mL z ultra čisto destilirano vodo (Gibco), avtoklavirali in čez noč izpostavili UV sevanju),

5. **1 µg/µL cRNA** (liofiliziranemu cRNA (EZ 1 DNA Investigator Kit, Qiagen) smo dodali 310 µL ultra čiste destilirane vode (Gibco), vorteksirali, alikvotirali po 10 µL in do uporabe zamrznili na -20 °C),
6. **1 M DTT** (154 mg DTT (Sigma-Aldrich) smo dodali 1 mL ultra čiste destilirane vode (Gibco) in 5 µL 2 M natrijevega acetata (s pH 5,2 in nato vorteksirali, alikvotirali in do uporabe zamrznili na -20 °C),
7. **2 M natrijev acetat** (8,203 g natrijevega acetata (Merck) smo dopolnili do 50 mL z ultra čisto destilirano vodo (Gibco), uravnali pH na 5,2 s pomočjo 1 M HCl in avtoklavirali),
8. **1 M HCl** (10 mL koncentrirane HCl (Merck) smo v avtoklavirani steklenici dopolnili do 100 mL z ultra čisto destilirano vodo (Gibco)) (36).

Materiali in aparature, ki smo jih uporabili pri izolaciji:

- sterilne laboratorijske rokavice (brez pudra, lateks),
- kirurške maske za obraz,
- prevleke za čevlje,
- halje za enkratno uporabo,
- zaščitne kape,
- avtoklav,
- centrifugirke (50 mL) (Sarstedt),
- primež (Proxxon),
- brusilnik (Dremel),
- brusilni nastavek (Proxxon),
- krožna diamantna žagica (Proxxon),
- citostatična komora (MC 3, Iskra Pio),
- pincete,
- spatule,
- staničevina,
- kartonske škatle,
- tehtnica (A&D Company),
- tekoči dušik,
- kladivo,
- kovinske komore s kovinsko kroglo (Tehtnica - Domel),
- homogenizator Bead Beater MillMix 20 (Tehtnica - Domel),
- termomešalnik Thermomixer comfort (Eppendorf),
- pipete,
- nastavki za pipete s filtrom (Eppendorf),
- EZ1 DNA Investigator Kit (vsebuje pufer G2 za lizo, proteinazo K, cRNA, vzorčne epruvete, elucijske epruvete, konice s filtrom za enkratno uporabo in njihovo držalo, kartušo z reagenti) (Qiagen),

- Biorobot EZ1 (Qiagen),
- EZ1 Investigator Card (raziskovalna kartica) (Qiagen),
- centrifuga Megafuge 1.0 (Heracus),
- mikrocentrifugirke (2 mL / 1,5 mL) (Eppendorf),
- bidestilirana voda (Millipore ali Sartorius-Stedium Biotech),
- natrijev hipoklorit (6%) (Kemika),
- pH indikatorski trakci.

Čiščenje kosti in zob

Nepravilno ravnanje, shranjevanje in čiščenje kosti in zob lahko vodi do površinske kontaminacije ali celo do kontaminacije globjih plasti, ki odvisi od poroznosti in ohranjenosti skeletiziranih posmrtnih ostankov (42-44). Kosti je zato potrebno očistiti mehansko in kemično, medtem ko pri zobeh mehansko čiščenje nadomesti obsevanje z UV svetlobo - tako znižamo količino prisotne kontaminirajoče DNA in inhibitorjev (40).

Vsa uporabljena orodja, materiali in reagenti so bili pred uporabo čez noč obsevani z UV svetlobo.

Kosti smo v zaprti citostatični komori v prostoru, ki je posebej namenjen čiščenju starih skeletnih elementov, mehansko očistili s pomočjo brusilnika in tako fizično odstranili površinsko plast, s krožno diamantno žagico vrezali utore v obliki mrežice za lažje lomljenje na manjše koščke, nato pa še kemično očistili z detergentom (5% Alconox), bidestilirano vodo in 80% etanolom in jih nato posušili. Med rezanjem in brušenjem smo kost hladili s tekočim dušikom, saj lahko toplota, ki se ob mehanskem čiščenju proizvaja, poškoduje endogeno DNA (45). Pri tem uporabljena orodja smo po vsakem vzorcu pred obdelavo naslednjega očistili z natrijevim hipokloritom, bidestilirano vodo in etanolom.

Zobe smo namesto mehanskega čiščenja očistili tako, da smo jih z obeh strani 30 minut obsevali z UV svetlobo, kemično pa z detergentom (5% Alconox), bidestilirano vodo in 80% etanolom ter jih posušili.

Pomembno je, da detergent dobro speremo, saj lahko v nadaljnjem postopku vpliva na reagente in razgradnjo DNA (36).

Postopek:

1. Vsa orodja in materiale, ki smo jih uporabljali, smo čez noč obsevali z UV svetlobo.
2. * Kost (del večje ali celo manjšo) smo v zaprti citostatični komori vpeli v primež, z brusilnikom odstranili 1-3 mm površinske plasti z vseh strani kosti, jo ohladili s tekočim dušikom in s krožno diamantno žagico z vseh strani vrezali vanjo plitve utor v obliki mreže in ponovno ohladili s tekočim dušikom.
3. * Očiščen del z vrezanimi utori smo s krožno diamantno žagico odrezali tako, da smo dobili košček, ki je tehtal približno 2-3 g, in ga s pinceto prenesli v sterilno plastično 50 mL centrifugirko, preostanek pa smo shranili.
4. ** Zobe smo obsevali z UV svetlobo 30 minut na eni strani in nato obrnili za 180 ° ter obsevali 30 minut še z druge strani.
5. Zobe in kosti smo v plastični 50 mL centrifugirki spirali s 5 % Alconox detergentom z rahlim stresanjem 30 sekund. Detergent smo nato odlili.
6. Z bidestilirano vodo smo spirali detergent z rahlim stresanjem 1 min in vodo nato odlili; spiranje z vodo smo ponovili približno tiktat oz. dokler nismo popolnoma sprali detergenta.
7. Z 80 % etanolom smo spirali kosti in zobe z rahlim stresanjem 1 minuto in etanol odlili. Spiranje z etanolom smo še enkrat ponovili.
8. Tako očiščene zobe in kosti smo pokrili s staničevino in posušili čez noč.
9. Vse uporabljene delovne površine smo očistili s 6 % natrijevim hipokloritom, bidestilirano vodo in 80 % etanolom ter UV sevanju izpostavili vse, kar smo imeli namen uporabljati naslednji dan.
10. Naslednji dan smo kosti in zobe v sterilnih 50 mL centrifugirkah stekali in zapisali težo.

* Velja le za kosti.

** Velja le za zobe.

Mletje kosti in zob ter demineralizacija

Za čim uspešnejšo demineralizacijo in ekstrakcijo DNA je ključnega pomena, da zmeljemo kosti in zobe v kar se da fini prah in tako omogočimo, da je čim večja površina vzorca v stiku s kelacijsko raztopino (40). Mletje smo izvedli s pomočjo homogenizatorja in

tekočega dušika; s slednjim smo hladili vzorce in kovinske komore za mletje ter tako preprečili pregrevanje. Postopek dekalifikacije z 0,5 M EDTA omogoči ločbo celic kosti od kostne mase (46). EDTA močno veže kovinske ione, kot je denimo kalcij, in tako omogoča demineralizacijo (40). Za popolno demineralizacijo 1 g prahu kosti ali zob je potrebnih 15 mL 0,5 M EDTA (48). Pri svežih skeletiziranih posmrtnih ostankih demineralizacija ni potrebna, medtem ko je pri izolaciji DNA iz starejših skeletiziranih posmrtnih ostankov ključnega pomena za pridobitev večjih količin DNA iz vzorcev (47). Vsa uporabljena orodja, materiali in reagenti so bili predhodno čez noč obsevani z UV svetlobo.

Postopek:

1. Kosti in zobe v 50 mL centrifugirki smo ohladili s tekočim dušikom in počakali, da je izhlapel.
2. S tekočim dušikom smo večkrat ohladili spodnji del kovinske komore za mletje.
3. Ohlajen vzorec smo s pinceto prenesli v sterilno kos rokavice (prst) in vse skupaj ovili v sterilno staničevino ter s pomočjo kladiva zlomili na manjše koščke.
4. Koščke smo prenesli v ohrajen del kovinske komore za mletje, dodali kovinsko kroglo, komoro zaprli in jo vstavili v homogenizator ter mleli pri 30 Hz 1-2 minuti.
5. Dobljen prah smo prenesli v svežo sterilno 50 mL centrifugirko, stehali in zapisali težo.
6. Za demineralizacijo smo 0,5 g prahu pustili v centrifugirki, preostanek pa prenesli v mikrocentrifugirke in zamrznili pri -20 °C.
7. Za vsako serijo smo uporabili dodatno, sterilno centrifugirko, ki nam je služila v namen negativne kontrole.
8. Vzorcem prahu in vzorcju negativne kontrole smo dodali 10 mL 0,5 M EDTA in vorteksirali 10 sekund.
9. Vse vzorce smo čez noč inkubirali v termomešalniku pri 37 °C in 750 obratih na minuto.
10. Vse potrebno za delo prihodnji dan smo čez noč izpostavili UV svetlobi.
11. Naslednji dan smo vzorce centrifugirali 15 minut na 1300g, brez zavore.
12. Odpipetirali in zavrgli smo celoten supernatant; pri negativni kontroli smo pustili približno 100 µL.

13. Dodali smo 10 mL sterilne bidestilirane vode in 10 sekund vorteksirali pri visoki hitrosti.
14. Ponovno smo centrifugirali 15 minut na 1300g, odpipetirali in zavrgli supernatant ter oborino in 100 μ L negativne kontrole uporabili v nadaljnjem postopku ekstrakcije in čiščenja.

Ekstrakcija in čiščenje DNA

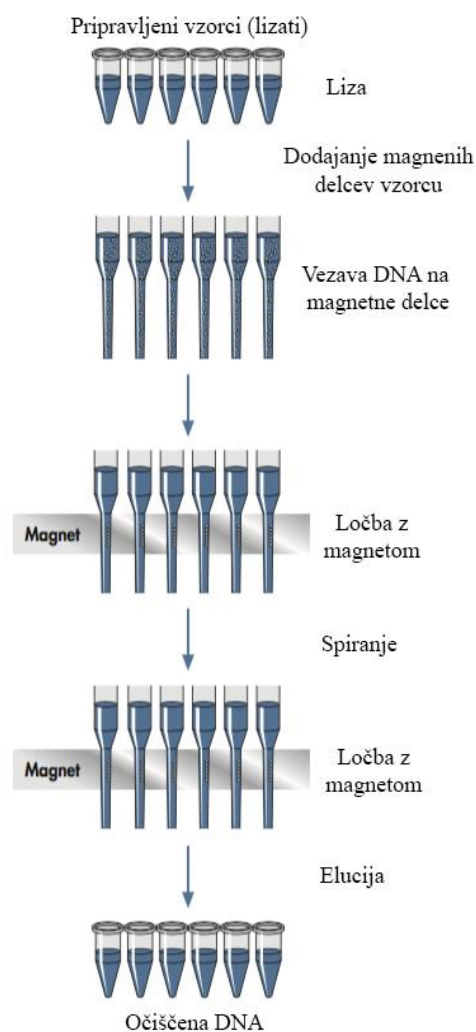
Ekstrakcijo in purifikacijo smo izvedli s pomočjo naprave Biorobot EZ1 (Qiagen) in EZ1 DNA Investigator raziskovalne kartice (Qiagen) ter kompleta EZ1 DNA Investigator Kit (Qiagen). Oborini, dobljeni po demineralizaciji, in negativni kontroli smo dodali ekstrakcijski pufer (G2) za lizo, proteinazo K (endolitična serinska proteaza, ki cepi proteine na posamezne aminokisljine) in DTT (reducent, ki cepi disulfidni most med cisteinskima ostanekoma v proteinu) ter po inkubaciji pridobili lizat z ekstrahirano DNA, ki smo jo očistili s pomočjo naprave Biorobot EZ1 (Qiagen) (36). Princip čiščenja DNA z napravo Biorobot EZ1 (Qiagen) temelji na vezavi molekul DNA na površino magnetnih delcev, ki so prevlečeni s silicijem; vezava poteka v prisotnosti kaotropičnih soli. Naprava magnetne delce z vezanimi molekulami DNA od preostanka lizata loči s pomočjo magneta, nato pa magnetne delce spira in eluira z vodo ali s pufrom (49).

Ob višji temperaturi inkubacije se pri lizi sprosti več DNA, predvsem, če je prah mlet bolj grobo, vendar pa z višanjem temperature tvegamo poškodbo molekul DNA (36).

Dodana cRNA omogoča boljšo vezavo molekul DNA na površino magnetnih delcev, še posebej, ko so količine DNA v vzorcu majhne (< 100 ng), ter tako pripomore k višjim količinam izolirane DNA po eluciji (49).

V celoten proces ekstrakcije in čiščenja DNA smo vedno vključili negativno kontrolo in s tem nadzorovali čistost uporabljenih materialov in reagentov.

Na **Sliki 6** je prikazan postopek čiščenja DNA v napravi BioRobot EZ1 s kompletom EZ1 DNA Investigator Kit. Po dodatku magnetnih delcev lizatu, se DNA veže na s silicijem prevlečene magnetne delce, ki jih s pomočjo magneta naprava loči od lizata in jih spira, po spiranju pa sledi ponovna ločba in elucija očiščene DNA.



Slika 6: Shematski prikaz čiščenja DNA v napravi BioRobot EZ1 s kompletom EZ1 DNA Investigator Kit. Slika povzeta po (49).

Postopek:

1. Oborini, dobljeni po dekalifikaciji, in negativni kontroli smo dodali
 - 100 μ L pufra G2 za lizo,
 - 60 μ L proteinaze K,
 - 20 μ L DTT.
2. Vorteksirali smo 10 s.
3. Inkubirali smo v termomešalniku 2-3 ure pri 56 °C in 750 rpm.
4. Dobljen lizat in negativno kontrolo smo centrifugirali 2 min pri 600g.
5. 400 μ L lizata in 200 μ L negativne kontrole smo s pipeto prenesli v vzorčne epruvetke; preostanek lizata smo shranili v zmrzovalniku pri -20 °C.

6. Lizatu in negativni kontroli smo dodali 1 μ L cRNA, ki smo jo tik pred uporabo odtalili.
7. DNA smo očistili s pomočjo naprave BioRobot EZ1 (Qiagen), raziskovalne kartice EZ1 Investigator Card in kompleta EZ1 Investigator Kit po navodilih proizvajalca (49).
8. Elucijske epruvete z očiščeno DNA in negativno kontrolo smo kratkoročno shranjevali pri 4 °C, dolgoročno pa pri -20 °C (36).

DNA iz brisov ustne sluznice smo pridobili z napravo BioRobot EZ1 (Qiagen), raziskovalno kartico EZ1 Investigator Card in kompletom EZ1 Investigator Kit po navodilih proizvajalca (49).

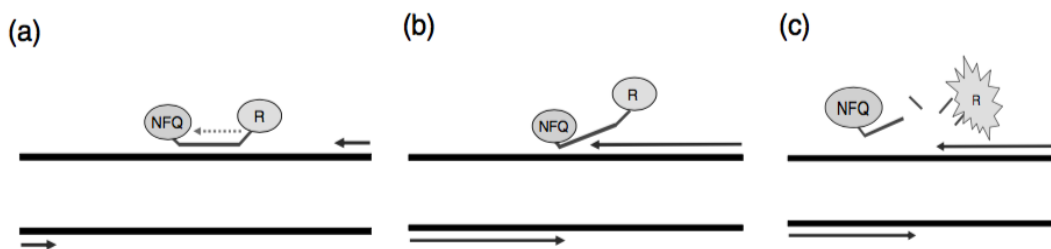
KVANTIFIKACIJA DNA Z RT-PCR (določitev količine DNA v ekstraktih z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času)

Po izolaciji smo določili količino izolirane DNA in ocenili njeno kvaliteto, z namenom da smo pri pomnoževanju lokusov STR v reakciji PCR, ki je sledilo, lahko proces optimizirali in pridobili kvalitetne rezultate v najkrajšem možnem času. Slednje je še posebej pomembno, če izoliramo DNA iz starih skeletnih ostankov, katerih ohranjenost in posledično količina in kvaliteta ekstrahirane DNA je nizka oziroma slaba. Če v reakciji PCR uporabimo preveliko ali premajhno količino DNA, lahko na koncu dobimo genetske profile, katerih interpretacija ni mogoča ali je le delno mogoča (35). Mnogi kompleti za pomnoževanje lokusov STR v reakciji PCR potrebujejo za optimalni potek reakcije določeno koncentracijo začetne, matrične DNA (34). Ob premajni začetni količini lahko pride do stohastičnega efekta - heterozigotni lokusi se neenakomerno pomnožujejo, kar privede do izpada alela in povzroči navidezno homozigotnost dotičnega lokusa (50). Če je začetna količina prevelika, lahko pride do tvorbe artefaktov med reakcijo PCR zaradi zdrsa polimeraze, kar se odraži kot adicija ali delecija osnovnega motiva lokusa STR - slednje lahko s pomočjo kvantifikacije delno ali v celoti odpravimo, saj dodamo v reakcijo PCR optimalno količino DNA (34).

Kvantifikacijo smo izvedli s kvantitativno reakcijo PCR v realnem času, ki je trenutno zlati standard kvantifikacije DNA vzorcev in nepogrešljiv del analiz, kjer je količina izolirane DNA majhna (34). Metoda temelji na klasični reakciji PCR, vendar lahko pri PCR v

realnem času sproti neprekinjeno zaznavamo količino pomnoženih PCR - produktov. Tovrstno sprotno spremljanje nam omogoča fluorescentno označena hidrolizirajoča sonda, dva specifična oligonukleotidna začetnika in Taq DNA polimeraza s 5'-eksonukleazno aktivnostjo. Sonda je označena - na 5' koncu ima vezano fluorescenčno barvilo, ki ga imenujemo reporter, na 3' koncu pa dušilec, ki zavira fluorescenco - in ima zaporedje, ki je komplementarno tistemu znotraj tarčnega odseka, ki ga pomnožujemo, in ki je definiran z oligonukleotidnima začetnikoma. Med reakcijo PCR v koraku podaljševanja verige pride zaradi 5'-eksonukleazne aktivnosti Taq DNA polimeraze do hidrolize sonde, ki je vezana znotraj tarčnega odseka DNA. Ker je zaviranje fluorescence mogoče le, kadar sta fluorofor in dušilec v neposredni bližini, pride ob hidrolizi sonde do porasta fluorescence, saj fluorofor in dušilec več nista v neposredni bližini. Več PCR - produktov se pomnoži, več fluorescenčnih molekul se sprosti in fluorescenčni signal, ki ga sproti zaznavamo, je močnejši (35). Pomnoževanje tarčnih odsekov poteka v več ciklih, po vsakem izmed njih se količina pomnoženih produktov meri s pomočjo fluorescenčnega signala. Točka, pri kateri je pomnoženih dovolj kopij, da fluorescenca preseže prazno vrednost, se zgodi pri določenem številu ciklov, ki jih označimo s Ct (*angl. cycle threshold*) (51). Prazna vrednost fluorescence je ekvivalentna specifični količini DNA. Ko je pomnoženih dovolj kopij DNA, da je prazna vrednost dosežena, računalniški program na podlagi števila ciklov, ki so bili za to potrebni, s pomočjo standardne krivulje izračuna količino začetne matrične DNA. Standardno krivuljo pripravimo s pomočjo DNA znane koncentracije (standarda), ki jo serijsko redčimo in analiziramo hkrati z vzorci DNA neznane koncentracije (34). Metoda je zelo občutljiva in specifična za človeško DNA (35).

Na **Sliki 7** je prikazan potek vezave in razgradnje hidrolizirajoče sonde na tarčni odsek enoverižne DNA. (a) Hidrolizirajoča fluorescenčno označena sonda se veže na komplementarno zaporedje znotraj tarčnega odseka DNA. (b) Ob podaljševanju verige Taq DNA polimeraza s 5'-eksonukleazno aktivnostjo povzroči razgradnjo sonde. (c) Fluorescenčno barvilo (reporter - R) ni več v bližini dušilca (NFQ - non fluorescent quencher), zato lahko fluorescira.



Slika 7: Prikaz vezave in razgradnje hidrolizirajoče sode na tarčni odsek enoverižne DNA. Slika povzeta po (35).

Za kvantifikacijo vseh vzorcev smo uporabili komplet PowerQuant™ System (Promega) in jo izvedli v napravi 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ter rezultate vrednotili s pomočjo računalniškega programa PowerQuant Analysis Tool in HID Real-Time PCR Analysis Software 1.2.

Uporabljeni materiali, reagenti in aparature:

- kvantifikacijska plošča MicroAmp® (Applied Biosystems),
- pipete,
- nastavki za pipete s filtrom (Eppendorf),
- računalniški program PowerQuant Analysis Tool in HID Real-Time PCR Analysis Software 1.2,
- 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems),
- komplet PowerQuant™ System (Promega) (vsebuje PowerQuant™ 2X Master Mix, PowerQuant™ 20X Primer/Probe/IPC Mix, ultra čisto vodo, PowerQuant™ Male gDNA Standard, PowerQuant™ Dilution Buffer),
- optični adhezivni film MicroAmp® (Applied Biosystems),
- mikrocentrifugirke.

PowerQuant™ System (Promega)

Rezultati kvantifikacije s kompletom PowerQuant™ System nam poleg količine DNA v vzorcih pokažejo, ali so vzorci DNA primerni za analizo lokusov STR, kateri komplet za pomnoževanje lokusov STR je najprimernejši, degradiranost molekule DNA in prisotnost inhibitorjev reakcije PCR (52).

S kompletom smo v vsakem vzorcu pomnoževali naslednja tarčna področja DNA:

- krajše področje avtosomske DNA (84 bp, sonda označena s barvilom FAM, za kvantifikacijo DNA, prisotne v vzorcu),
- drugo, daljše področje na istem lokusu avtosomske DNA (294 bp, sonda označena z barvilom Quasar® 670, področje zaradi dolžine bolj dovzetno za degradacijo in inhibitorje, s pomočjo razmerja količine krajšega in daljšega fragmenta lahko ocenimo stopnjo degradacije),
- področji na kromosomu Y (81 bp in 136 bp, sonda označena z barvilom CAL Fluor® Gold 540, za detekcijo prisotnosti moške DNA),
- notranjo pozitivno PCR - kontrolo (IPC) (435 bp, sonda označena z barvilom TMR, zaradi dolžine tarčnega odseka je IPC bolj podvržena morebitnim inhibitorjem, zato na ta način detektiramo prisotnost inhibitorjev reakcije PCR v vzorcih) (52).

V vsaki reakciji je prisotno pasivno referenčno barvilo CXR, katerega signal služi za uravnavanje signalov ostalih barvil (52).

Za izdelavo standardne krivulje smo uporabili štiri raztopine različnih koncentracij standarda PowerQuant™ Male gDNA; začetna koncentracija je bila 50 ng/μL, nato pa smo standard še 25-kratno trikrat serijsko redčili s pufrom PowerQuant™ Dilution Buffer za redčenje in pridobili redčitve s koncentracijami 2 ng/μL, 0,08 ng/μL in 0,0032 ng/μL.

Postopek kvantifikacije s pripravo standardov:

1) Priprava standardov:

- a) Odtalili smo standard PowerQuant™ Male gDNA koncentracije 50 ng/μL in pufer za redčenje ter standard vorteksirali pri visoki hitrosti 10 sekund.
- b) 4 μL neredčenega standarda koncentracije 50 ng/μL smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali 96 μL pufera ter vorteksirali pri visoki hitrosti in dobili redčitev standarda s koncentracijo 2 ng/μL.
- c) 4 μL redčenega standarda s koncentracijo 2 ng/μL smo prenesli v novo centrifugirko in dodali 96 μL pufera ter vorteksirali pri visoki hitrosti in dobili redčitev standarda s koncentracijo 0,08 ng/μL.

- d) 4 μL redčenega standarda s koncentracijo 0,08 $\text{ng}/\mu\text{L}$ smo prenesli v novo centrifugirko in dodali 96 μL pufra ter vorteksirali pri visoki hitrosti in dobili zadnjo redčitev standarda s koncentracijo 0,0032 $\text{ng}/\mu\text{L}$.
- 2) Odtalili smo reagenta PowerQuant™ 2X Master Mix in PowerQuant™ 20X Primer/Probe/IPC Mix na sobni temperaturi in nato vorteksirali 10 sekund.
 - 3) Določili smo število reakcij za kvantifikacijo in izračunali volumne posameznih komponent reakcijske zmesi z upoštevanjem 10-15 % pribitka zaradi napake pri pipetiranju. Vse vzorce, standarde in negativno kontrolo smo pomnoževali dvakrat, kar smo upoštevali pri računanju volumnov komponent reakcijske zmesi. Sestava reakcijske zmesi je prikazana v *Preglednici I*.
 - 4) V skladu z izračunom smo pripravili reakcijsko zmes z ultra čisto vodo in reagentoma PowerQuant™ 2X Master Mix in PowerQuant™ 20X Primer/Probe/IPC Mix.
 - 5) Pripravljeno mešanico smo vorteksirali.
 - 6) V vsako vdolbinico reakcijske plošče smo dodali 18 μL reakcijske zmesi.
 - 7) V vsako vdolbinico reakcijske plošče smo dodali 2 μL vzorca (neznane DNA, standarda ali negativne kontrole) v dvojniku.
 - 8) Kvantifikacijsko ploščo smo prekrili z optičnim adhezivnim filmom in preverili, da slednji dobro drži.
 - 9) Ploščo smo kratko centrifugirali.
 - 10) Kvantifikacijo smo izvedli s pomočjo naprave 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ter računalniškega programa PowerQuant Analysis Tool (Promega) in HID Real-Time PCR Analysis Software 1.2 po navodilih proizvajalca (52).

Reakcija kvantifikacije je potekala pod naslednjimi pogoji:

- 1) Začetna denaturacija 2 minuti pri 98 °C.
- 2) 39 ciklov s 15 sekund denaturacije pri 98 °C in 35 sekund prileganja pri 62 °C.
- 3) Prag fluorescenčnega signala je bil za posamezne fluorofore sledeč:
 - a) avtosomski fragment 0,2;
 - b) degradacijski (daljši avtosomski) fragment 0,2;
 - c) fragment notranje pozitivne kontrole 0,03;
 - d) fragment kromosoma Y 0,2.

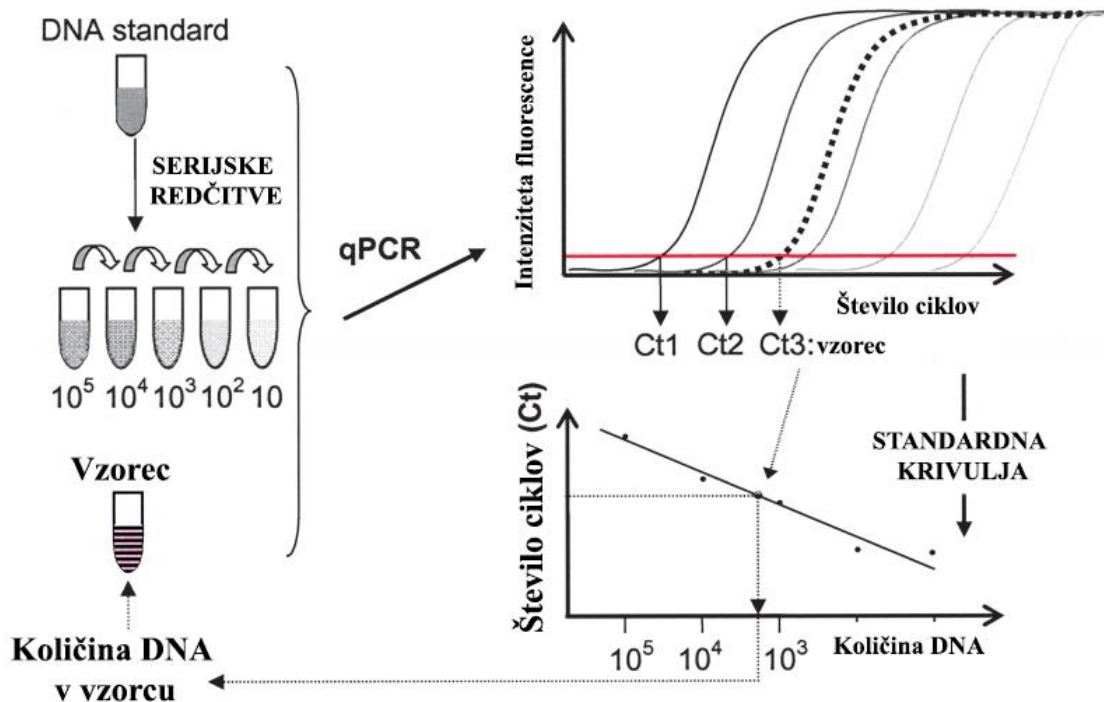
V **Preglednici I** je prikazana sestava reakcijske zmesi za kvantifikacijo po posameznih komponentah in volumni le-teh. Povzeto po (52).

Preglednica I: Prikaz posameznih komponent reakcijske zmesi in njihovih volumnov za kvantifikacijo enega vzorca.

Komponente	Volumen (μL)	
Ultra čista voda	7	18
PowerQuant™ 2X Master Mix	10	
PowerQuant™ 20X Primer/Probe/IPC Mix	1	
Vzorec (neznana DNA, negativna kontrola ali standard)	2	
Končni volumen reakcijske zmesi za en vzorec	20	

Vsaka kvantifikacija je poleg vzorcev neznane DNA in standardov vsebovala tudi negativno kontrolno, ki je v reakcijski mešanici kot komponento vzorca vsebovala 2 μL ultra čiste vode ali pufer TE (pH 8,0). Zaradi zelo visoke občutljivosti kompleta PowerQuant™ System lahko pri negativni kontroli pride do pomnoževanja in tvorbe produktov v subpikogramskih količinah (52).

Na **Sliki 8** je prikazana shema postopka kvantifikacije. Redčitve, prikazane v shemi, so drugačne od redčitev, ki smo jih za izris standardne krivulje uporabili pri naši kvantifikaciji.



Slika 8: Shematski prikaz postopka kvantifikacije. Slika povzeta po (53).

PROFIL DNA

Skupek kombinacije števil, ki opisujejo alele v preiskovanem vzorcu, predstavlja genetski profil, ki ga imenujemo tudi profil DNA ali profil STR. Lokusi, na katerih se nahajajo aleli, ki jih preiskujemo, imajo posebne oznake, kot so denimo D3, D21, FGA, vWA, ki omogočajo njihovo identifikacijo. Podobno kot lokusi, imajo tudi aleli oznake; slednje opisujejo število ponovitev osnovnega motiva lokusa STR (ta je povezana z dolžino fragmenta DNA) in omogočajo razlikovanje med različnimi profili.

Človeški genom vsebuje mnogo različnih lokusov STR, na vsakem izmed njih pa so različni aleli, vendar pa je na posameznem lokusu le določeno število različnih alelov. Tako je za čim boljše individualizacijo pri ustvarjanju DNA profila potrebno analizirati več različnih lokusov in pripadajočih alelov hkrati.

Z izolirano, očiščeno in kvantificirano DNA smo ob pomnoževanju v reakciji PCR ustvarili profil DNA. V eni reakciji PCR smo pomnoževali več lokusov STR hkrati in pri tem pridobili skupek pomnoženih in različno fluorescentno označenih alelov za preiskovane lokuse STR. Pomnožene produkte smo nato ločili s kapilarno elektroforezo in

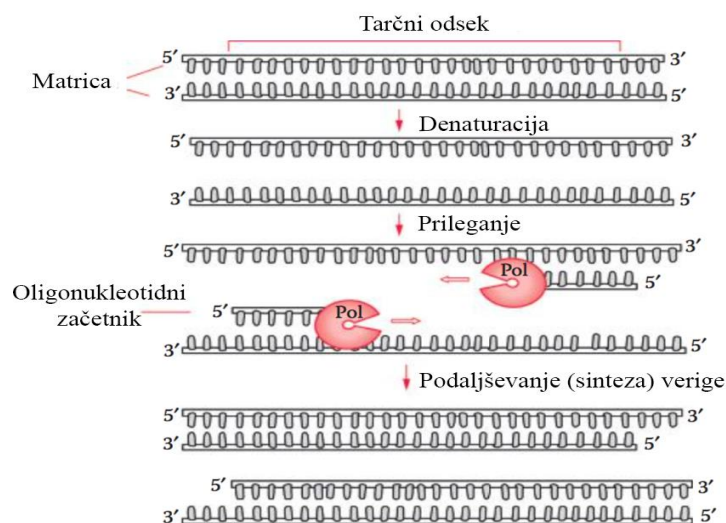
jih detektirali s pomočjo označenih barvil ter pridobili elektroferogram, ki je predstavljal in nam služil za določitev profila DNA.

POMNOŽEVANJE LOKUSOV STR V REAKCIJI PCR (TIPIZACIJA LOKUSOV STR)

Reakcija PCR je proces, pri katerem iz manjše količine očiščene DNA pridobimo večjo količino enega ali več specifičnih področij DNA, ki jih tekom reakcije pomnožujemo. V osnovi metoda sestoji iz treh korakov - denaturacija, prileganje in podaljševanje.

V fazi denaturacije se ob segrevanju verigi DNA razkleneta. Sledi faza prileganja, kjer se ob nižanju temperature na denaturirano, enoverižno DNA vežejo specifični oligonukleotidni začetniki, ki določajo mejna področja tarčnega odseka, ki ga želimo pomnožiti. Sledi tretji korak, kjer pride ob rahlo povišani temperaturi v prisotnosti encimske aktivnosti encima polimeraze do podaljševanja verige DNA, ki se začne pri oligonukleotidnem začetniku, vezanem na enoverižno DNA. Po koncu podaljševanja nastane na novo pomnožen dvoverižni tarčni odsek DNA. Koraki denaturacije, prileganja in podaljševanja se večkrat ciklično ponovijo; po vsakem ciklu se število kopij tarčnega odseka podvoji (34).

Na **Sliki 9** je prikazan potek reakcije PCR. Prikazan je tarčni odsek in začetna denaturacija, ki ji sledi prileganje specifičnih oligonukleotidnih začetnikov na komplementarna področja razklenjene enoverižne DNA ter faza podaljševanja verige in nova kopija tarčnega odseka.



Slika 9: Shematski prikaz poteka enega cikla reakcije PCR. Slika povzeta po (57).

Za pridobitev profilov DNA so tarčna področja v reakciji PCR različni lokusi STR, ki so zelo polimorfni in pri katerih je pojavnost alelov (alelna frekvenca) v človeški populaciji znana. Kompleti za analizo vsebujejo kombinacijo oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje več lokusov STR hkrati, poleg tega pa vsebujejo še oligonukleotidne začetnike za pomnoževanje amelogeninskega lokusa, s katerim identificiramo alela na kromosomu X in Y in določimo spol. Oligonukleotidni začetniki omogočajo pomnoževanje ne glede na dolžino posameznega alela na tarčnem lokusu - po en par oligonukleotidnih začetnikov za vsak preiskovani lokus nam torej omogoči, da ustvarimo DNA - profil za katerokoli osebo, ne glede na to, kateri aleli se nahajajo na teh lokusih (34).

Sprotno označevanje produktov reakcije PCR med pomnoževanjem nam omogoči njihovo samodejno zaznavo. Gre za označevanje s fluorofori, ki po vzbujanju z lasersko svetlobo znane valovne dolžine oddajajo fluorescentno svetlobo, katere valovna dolžina je prav tako znana in jo detektiramo z detektorjem. Detektirana svetloba potrdi prisotnost pomnoženih produktov PCR, intenziteta signala predstavlja njihovo količino, čas elektroforezne ločbe pa je odvisen od velikosti produkta PCR. Uporaba različnih barvil pri označevanju nam omogoča analizo večjega števila lokusov hkrati (34).

Če pomnoževanje preiskovanih lokusov v reakciji PCR ni popolnoma uspešno, je možno pridobiti le delni profil ali sploh nobenega - interpretacija je zato otežena ali nemogoča. Vzroki za to so lahko mutacije, stohastični efekt, artefakti, prisotnost inhibitorjev PCR - reakcije in degradiranost preiskovane DNA. Če gre za mutacijo znotraj področja STR, ki ga pomnožujemo, bo reakcija PCR vseeno potekla, vendar bo v končnem rezultatu prikazan alel, ki bo navidezno drugačne velikosti od pričakovane - tak dogodek lahko močno oteži ali onemogoči interpretacijo DNA - profila. Po drugi strani lahko pride do pojava mutacije v področju, na katerega se veže oligonukleotidni začetnik, kar lahko zmanjša njegovo vezavno afiniteto in vpliva na učinkovitost pomnoževanja tarčnega odseka (54). Zaradi premajhne začetne količine DNA lahko pri rezultatih opazimo neravnovesje pri višini vrhov v elektroferogramu, izpad ali pojav alelov, preferenčno pomnoževanje lokusov in zdrs polimeraze, ki se odraža v napačnem prikazu števila ponovitev osnovnega motiva lokusa STR (34). Če iz vzorca predhodno ne uspemo izločiti inhibitorjev reakcije PCR, denimo huminskih kislin in nekaterih v zemlji prisotnih organskih spojin, lahko le-ti vplivajo na aktivnost DNA - polimeraze preko interakcije s

samim encimom ali preko vezave na DNA v vzorcu; količina PCR - produktov se zato lahko zmanjša celo pod mejo detekcije (55).

Vse reakcije PCR smo izvedli v napravi *Mastercycler® nexus* gradient (Eppendorf) ob uporabi različnih pomnoževalnih ali amplifikacijskih kompletov *ESSplex SE QS* (Qiagen), *ESSplex Plus* (Qiagen), *PowerPlex® Y23 System* (Promega), *PowerPlex® ESI 17 Pro System* (Promega) in *AmpFlSTR® NGM* (Thermo Fisher Scientific). Lokusi in vzorci, ki smo jih analizirali s posameznim amplifikacijskim kompletom, so prikazani v *Preglednici II*.

V **Preglednici II** so prikazani lokusi in vzorci, ki smo jih analizirali s posameznim amplifikacijskim kompletom ter vzorci, ki smo jih s posameznim kompletom pomnožili.

Preglednica II: Amplifikacijski kompleti z lokusi, ki jih pomnožujejo, ter vzorci, ki smo jih s posameznim kompletom pomnožili.

	<i>ESSplex SE QS (Qiagen)</i>	<i>ESSplex Plus (Qiagen)</i>	<i>PowerPlex® Y23 System (Promega)</i>	<i>PowerPlex® ESI 17 Pro System (Promega)</i>	<i>AmpFlSTR® NGM (Thermo Fisher Scientific)</i>
Pomnoževani lokusi	D1S1656, D2S441, D2S1338, D3S1358, D8S1179, D10S1248, D12S391, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D22S1045, FGA, TH0, vWA, SE33, amelogenin.	D1S1656, D2S441, D2S1338, D3S1358, D8S1179, D10S1248, D12S391, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D22S1045, FGA, TH01, vWA, amelogenin.	DYS576, DYS389I, DYS448, DYS389II, DYS19, DYS391, DYS481, DYS549, DYS533, DYS438, DYS437, DYS570, DYS635, DYS390, DYS439, DYS392, DYS643,	D22S1045, D2S1338, D19S433, D3S1358, amelogenin, D2S441, D10S1248, D1S1656, D18S51, D16S539, D12S391, D21S11, vWA, TH01, SE33, FGA, D8S1179.	D22S1045, D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01, FGA, D1S1656, D12S391, D10S1248, D22S1045, D2S44, amelogenin.

			DYS393, DYS458, DYS385a/b, DYS456 in Y- GATA-H4.		
Vzorci, ki smo jih pomnožili s kompletom	Vzorci iz grobišča Huda jama (avtosomna področja STR).	Vzorci iz moškega groba v grobišču Babna Gora (avtosomna področja STR).	Vzorci iz moškega groba v grobišču Babna Gora (STR - področja kromosoma Y).	Vzorci iz ženskega groba v grobišču Babna Gora (avtosomna področja STR).	Vzorci iz ženskega groba v grobišču Babna Gora, vzorci za eliminacijsko zbirko, vzorci referenčnih oseb (avtosomna področja STR).

Vsi kompleti so vsebovali reakcijsko mešanico, mešanico oligonukleotidnih začetnikov, kontrolno DNA, DNA - velikostni standard in alelni lestvico.

Najprimernejša začetna količina DNA za posamezni komplet:

- **ESSPlex SE QS (Qiagen):** med 0,2 in 2 ng DNA, vendar je zanesljive rezultate možno pridobiti tudi iz manj kot 0,1 ng začetne DNA (56).
- **ESSPlex Plus (Qiagen):** med 0,2 in 0,5 ng DNA, vendar je zanesljive rezultate možno pridobiti tudi iz manj kot 0,1 ng začetne DNA (60).
- **PowerPlex® Y23 System (Promega):** 0,5 ng DNA (62).
- **PowerPlex® ESI 17 Pro System (Promega):** 0,5 ng DNA (61).
- **AmpFℓSTR® NGM (Thermo Fisher Scientific):** 1 ng DNA (63).

Postopek amplifikacije:

1. Pred uporabo smo vse reagente odtalili, premešali in kratko centrifugirali.

2. Pripravili smo mešanico reagentov, pri čemer smo upoštevali pribitek zaradi izgub pri pipetiranju.
3. Mešanico smo premešali in pipetirali v vdolbinice reakcijske plošče.
4. Dodali smo vodo iz kompleta (proizvajalec zanjo zagotavlja, da ne vsebuje nukleaz) in vzorec DNA v ustreznem razmerju. Sestave reakcijskih mešanic za posamezni komplet so prikazane v *Preglednicah III, IV, V, VI in VII*.
5. Pripravili smo pozitivno kontrolo (kontrolna DNA iz amplifikacijskega kompleta) in negativno kontrolo (vodo iz kompleta, za katero proizvajalec zagotavlja, da ne vsebuje nukleaz).
6. PCR - reakcije smo izvedli po navodilih proizvajalcev (56, 60, 61, 62, 63) v napravi *Mastercycler® nexus gradient* (Eppendorf). Pogoji poteka reakcije PCR za posamezne amplifikacijske komplete so navedeni pod pripadajočimi preglednicami, ki opisujejo sestavo reakcijskih mešanic za posamezni komplet (*Preglednice III, IV, V, VI, VII*).

V **Preglednici III** je prikazana sestava reakcijske mešanice in volumni posameznih komponent za amplifikacijo s kompletom ESSPlex SE QS (Qiagen).

Preglednica III.: Sestava reakcijske mešanice za amplifikacijo s kompletom ESSPlex SE QS (Qiagen).

Komponente	Volumen (µL)	
Fast Reaction Mix 2,0	7,5	10
mešanica oligonukleotidnih začetnikov	2,5	
Vzorec (neznana DNA, negativna kontrola ali pozitivna kontrola)	variabilno	
Voda	variabilno	
Končni volumen reakcijske zmesi za en vzorec	25	

Pogoji poteka amplifikacije:

- 3 cikli pri: 30 sekund 98 °C, 55 sekund 64 °C, 5 sekund 72 °C.
- 27 ciklov pri: 10 sekund 96 °C, 55 sekund 61 °C, 5 sekund 72 °C.
- 2 minuti pri 68 °C.
- Ohladitev pri 10 °C.

V **Preglednici IV** je prikazana sestava reakcijske mešanice in volumni posameznih komponent za amplifikacijo s kompletom Investigator ESSPlex Plus (Qiagen).

Preglednica IV: Sestava reakcijske mešanice za amplifikacijo s kompletom Investigator ESSPlex Plus (Qiagen).

Komponente	Volumen (μL)	
Fast Reaction Mix	7,5	10
mešanica oligonukleotidnih začetnikov	2,5	
Vzorec (neznana DNA, negativna kontrola ali pozitivna kontrola)	variabilno	
Voda	variabilno	
Končni volumen reakcijske zmesi za en vzorec	25	

Pogoji poteka amplifikacije:

- 5 minut pri 95 °C.
- 30 ciklov pri: 10 sekund 96 °C, 120 sekund 61 °C.
- Ohladitev pri 10 °C.

V **Preglednici V** je prikazana sestava reakcijske mešanice in volumni posameznih komponent za amplifikacijo s kompletom PowerPlex® Y23 System (Promega).

Preglednica V: Sestava reakcijske mešanice za amplifikacijo s kompletom PowerPlex® Y23 System (Promega).

Komponente	Volumen (μL)	
PowerPlex® Y23 5X Master Mix	5	7,5
mešanica oligonukleotidnih začetnikov	2,5	
Vzorec (neznana DNA, negativna kontrola ali pozitivna kontrola)	variabilno	
Voda	variabilno	
Končni volumen reakcijske zmesi za en vzorec	25	

Pogoji poteka amplifikacije:

- 2 minuti pri 96 °C.
- 30 ciklov pri: 10 sekund 94 °C, 1 minuta 61 °C, 30 sekund 72 °C.
- 20 minut pri 60 °C.
- Ohladitev pri 4 °C.

V **Preglednici VI** je prikazana sestava reakcijske mešanice in volumni posameznih komponent za amplifikacijo s kompletom PowerPlex® ESI 17 Pro System (Promega).

Preglednica VI: Sestava reakcijske mešanice za amplifikacijo s kompletom PowerPlex® ESI 17 Pro System (Promega).

Komponente	Volumen (µL)	
PowerPlex® ESI 5X Master Mix	5	7,5
mešanica oligonukleotidnih začetnikov	2,5	
Vzorec (neznana DNA, negativna kontrola ali pozitivna kontrola)	variabilno	
Voda	variabilno	
Končni volumen reakcijske zmesi za en vzorec	25	

Pogoji poteka amplifikacije:

- 2 minuti pri 96 °C.
- 30 ciklov pri: 30 sekund 94 °C, 2 minuti 59 °C, 90 sekund 72 °C.
- 45 minut pri 60 °C.
- Ohladitev pri 4 °C.

V **Preglednici VII** je prikazana sestava reakcijske mešanice in volumni posameznih komponent za amplifikacijo s kompletom AmpFISTR® NGMTM PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific).

Preglednica VII: Sestava reakcijske mešanice za amplifikacijo s kompletom AmpFISTR® NGM™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific).

Komponente	Volumen (µL)	
AmpFISTR® NGM™ Master Mix	10	15
mešanica oligonukleotidnih začetnikov	5	
Vzorec (neznana DNA, negativna kontrola ali pozitivna kontrola)	variabilno	
Voda	variabilno	
Končni volumen reakcijske zmesi za en vzorec	25	

Pogoji amplifikacije:

- 11 minut pri 95 °C.

- 29 - 30 ciklov pri: 20 sekund 94 °C, 3 minute 59 °C.
- 10 minut pri 60 °C.
- Ohladitev pri 4 °C.

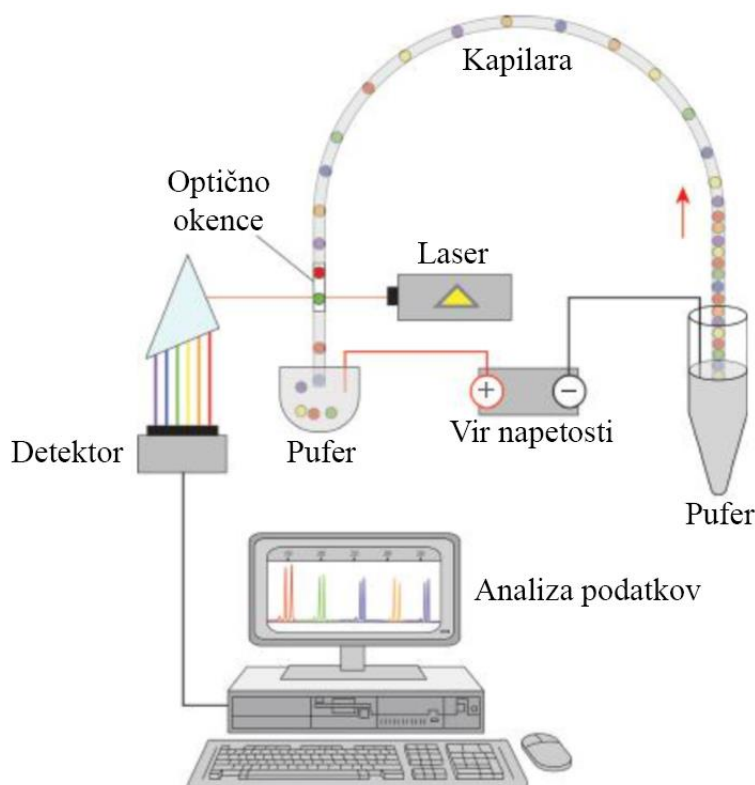
ELEKTROFOREZNA LOČBA IN DETEKCIJA POMNOŽENIH IN OZNAČENIH FRAGMENTOV DNA

Kapilarna elektroforeza je metoda, s katero lahko med seboj ločimo in zaznamo nabite makromolekule, kot so DNA, RNA, polisaharidi in proteini. Poglavitni del naprave za kapilarno elektroforezo je kapilara iz kremenčevega stekla z optičnim okencem. Ta omogoča detekcijo predhodno fluorescenčno označenih molekul, ki po vzbujanju z lasersko svetlobo določene valovne dolžine, ob prehodu nazaj v osnovno stanje oddajajo fluorescenčno svetlobo, to pa zazna detektor. Za analizo področij STR denaturiramo DNA z visoko temperaturo ali formamidom, ki ga dodamo pri pripravi vzorcev, ali sečnino, ki je dodana tekočemu polimeru. Z denaturacijo omogočimo bolj natančno določanje velikosti fragmentov in sicer tako, da preprečimo tvorbo sekundarnih struktur verig DNA, saj lahko le-te vplivajo na mobilnost fragmentov, kar se odraži v napačno določeni velikosti takega fragmenta. Vnos vzorcev v kapilaro poteka avtomatsko z elektrokinetičnim injiciranjem. Kapilara povezuje dva rezervoarja s pufrom, rezervoarja pa sta povezana z elektrodami. Ker so stene kapilar tanke, toplota skozi njih lažje prehaja, kar nam omogoča uporabo višjih napetosti zaradi boljšega hlajenja. DNA - fragmenti, ki jih ločujemo, se v električnem polju pomikajo proti pozitivno nabiti anodi; krajši fragmenti potujejo hitreje kot daljši. V splošnem lahko med seboj ločimo fragmente dolžine do 1000 nukleotidov z ločljivostjo na en nukleotid natančno (57, 58). Glede na vrsto in čas emitirane svetlobe vemo, kateri fragment je bil detektiran. Detektiran signal je prikazan v obliki elektroferograma. Računalniški program nam na koncu sestavi DNA - profil (34).

Ločbo in detekcijo smo izvedli z napravo *Genetic Analyzer 3130* (Applied Biosystems) in genske profile določili z računalniškim programom *GeneMapper ID v3.2* (Applied Biosystems).

Na **Sliki 10** je prikazan postopek ločbe in detekcije pomnoženih fragmentov s postopkom kapilarne elektroforeze. DNA - fragmenti potujejo različno hitro glede na njihovo velikost

skozi električno polje v kapilari proti pozitivno nabiti anodi. Skozi optično okence v kapilari jih tekom potovanja obsevamo z laserjem s svetlobo znane valovne dolžine, ki vzbudi fluorofore, ti pa nato oddajajo svetlobo drugačne valovne dolžine, ki jo zazna detektor. Signal emitirane svetlobe je s pomočjo računalnika prikazan kot elektroferogram, računalniški program pa sestavi DNA profil.



Slika 10: Shematski prikaz ločbe in detekcije pomnoženih fragmentov s kapilarno elektroforezo. Prirejeno po (57).

Postopek:

1. Pripravili smo mešanico formamida (*Hi-Di™ Formamide* (Applied Biosystems)) in DNA - velikostnega standarda, pripadajočega posameznemu amplifikacijskemu kompletu.
2. V vdolbinice testne plošče smo pipetirali mešanico formamida in DNA - velikostnega standarda za vsak vzorec.
3. Dodali smo 1 μ L PCR - produkta oz. alelno lestvico.
4. V prazne vdolbinice smo pipetirali formamid.
5. Pri 95 °C smo vzorce 3 minute denaturirali in nato za 3 minute testno ploščo postavili na led.

6. Ločbo in detekcijo pomnoženih produktov PCR smo izvedli z napravo *Genetic Analyzer 3130* (Applied Biosystems) in ustvarili genetske profile s programom *GeneMapper ID v3.2* (Applied Biosystems) po navodilih proizvajalca (56, 60, 61, 62, 63).

Za elektroforezo smo uporabili kapilarno dolžine 36 cm (Applied Biosystems), v kapilari je bil tekoči polimer POP-4 (4% polidimetilakrilamid, 8M sečnina, 5% 2-pirolidinon) (Applied Biosystems), uporabljen pufer pa 10x *Genetic Analyzer Buffer* z EDTA (Applied Biosystems) (56, 59).

STATISTIČNI IZRAČUNI VERJENOSTI SORODSTVENIH POVEZAV

Genetske profile, med katerimi smo želeli dokazati sorodstveno povezanost in ugotoviti njihov skupen izvor, smo med seboj primerjali. Ob ujemanju smo potrdili skupen izvor ter statistično ovrednotili moč genetskega dokaza. Za izračun verjetnosti sorodstvenih povezav s pomočjo avtosomskih področij STR smo uporabili program *DNA VIEW v. 37.37* (2017) (C. H. Brenner (Berkley, ZDA)). Upoštevali smo alelne frekvence v slovenski populaciji in predhodno verjetnost ($\text{prior} = 1/(n+1)$; n = število žrtev v grobišču) (74 – 77). Za haplotipe kromosoma Y smo statistično verjetnost sorodstvenih povezav izračunali s pomočjo frekvenc haplotipov (P) v podatkovni zbirki YHRD (*angl. Y chromosome haplotype reference database* (www.yhrd.org)) (78). Uporabili smo metodo štetja ($p = x / n$; p – frekvenca haplotipa, x – število ponovitev haplotipa, n – velikost podatkovne baze), upoštevali smo tudi korekcijski faktor za napake pri vzorčenju (78-80).

Verjetnost sorodstva med dvema osebama smo izrazili z verjetnostnim razmerjem (LR) (*angl. Likelihood ratio*). Če je šlo pri dveh osebah za ujemanje med avtosomskima genetskima profiloma in med haplotipoma kromosoma Y, smo to izrazili s skupnim verjetnostnim razmerjem LR_c , ki predstavlja produkt LR avtosomskega profila in LR haplotipa kromosoma Y (81). Verjetnostno razmerje nam pove, kolikokrat bolj verjetna je sorodstvena povezava med osebo, ki ji pripada preiskovani vzorec, in referenčno osebo, v primerjavi z naključno izbrano osebo iz primerjane populacije, ki z osebo, ki ji pripada preiskovani vzorec, ni v sorodu. Pri haplotipih kromosoma Y nam pove, kolikokrat verjetneje je, da osebi z identičnim haplotipom kromosoma Y pripadata isti paternalni liniji, kot pa da sta pripadnika različnih paternalnih linij (7).

Sorodstveno povezavo smo ovrednotili tudi s skupno naknadno verjetnostjo sorodstva (PPc) (*angl. Posterior probability combined*) z upoštevanjem predhodne verjetnosti in skupnim verjetnostnim razmerjem.

$$\mathbf{PPc = LRc * prior / (LRc * prior + (1 - prior)) * 100\%}$$

Skupna naknadna verjetnost sorodstva mora presegati vrednost 99,9% - le tako lahko potrdimo sorodstveno razmerje ali pozitivno identificiramo žrtev (77, 82, 83).

OBDELAVA PODATKOV

Rezultate smo statistično obdelali s programoma *Microsoft Office Excel 2016* in *IBM SPSS Statistics v23*.

Rodovnik za prikaz sorodstvenih povezav in identifikacijo žrtev iz grobišča Babna Gora smo ustvarili s spletno aplikacijo *Progeny Free Online Pedigree Tool* (Progeny Genetics LLC.) (66).

REZULTATI IN RAZPRAVA

ISKANJE NAJPRIMERNEJŠEGA SKELETNEGA ELEMENTA ZA IDENTIFIKACIJO ŽRTEV DRUGE SVETOVNE VOJNE – GROBIŠČE HUDA JAMA

REZULTATI KVANTIFIKACIJE

Ugotovili smo, da razlika v količini izolirane DNA med skeleti A, B in C ni bila signifikantna (ANOVA, $p = 0,205$), hkrati pa opazili razlike v količini izolirane DNA med različnimi tipi skeletnih elementov (KV = 141,2 % za vrednosti povprečnih količin DNA v ng/g kosti) (*Preglednica XI, Slika 11*).

Odsotnost kontaminacije smo preverili z negativno kontrolo reakcije PCR in negativno kontrolo ekstrakcije, pri katerih nismo zaznali DNA.

Najuspešnejših 20 elementov pri posameznem skeletu:

SKELET A: Med prvih 20 skeletnih elementov pri skeletu A glede na količino DNA, smo uvrstili kosti rok in nog, med katerimi smo največ DNA pridobili iz stopalnic, ter senčnico. Najmanj DNA smo uspeli pridobiti iz zob, pri katerih je 6/8 vzorcev bilo pod mejo detekcije pri postopku kvantifikacije. Rezultati so prikazani v *Preglednici VIII*.

SKELET B: Precej podobne rezultate smo dobili pri analizi elementov skeleta B, kjer so med prvimi dvajsetimi elementi, iz katerih smo uspeli pridobiti največ DNA, povečini kosti rok in nog (17/20), ledveno in prsno vretence ter senčnica. Največ DNA smo določili v dlančnici III, stopalnici I, proksimalni prstnici palca roke, medialni klinasti kosti in skočnici. Podobno kot pri skeletu A, smo tudi pri skeletu B najmanj DNA določili v vzorcih zob, kjer pri 4/8 vzorcev pri kvantifikaciji nismo zaznali prisotnosti DNA v vzorcih. Rezultati so prikazani v *Preglednici IX*.

SKELET C: Prvih 20 elementov, ki smo jim določili največjo količino DNA, predstavljajo pri skeletu C predvsem kosti rok in nog, med katerimi so najboljše dlančnice in stopalnice, poleg tega pa še senčnica in I. rebro. Najmanj DNA smo pri skeletu C pridobili iz vzorcev zob, kjer pri 4/8 vzorcev pri kvantifikaciji nismo zaznali prisotnosti DNA v vzorcih. Rezultati so prikazani v *Preglednici X*.

Pri vseh analiziranih vzorcih DNA nismo zaznali v 14 od skupno 168 vzorcev. V vseh primerih je šlo za zobe. (*Preglednice VIII, IX in X*)

Pri kvantifikaciji smo skupaj z vsakim vzorcem pomnoževali tudi notranjo pozitivno kontrolo v namen identificiranja inhibicije reakcije PCR. Parameter »IPC shift« je samodejno izračunan in predstavlja razliko v IPC Ct vrednosti vzorca in njemu najbližjega DNA - standarda (52). Večje ali nedoločene vrednosti pomenijo večjo stopnjo inhibicije; da lahko trdimo, da je v vzorcu prišlo do inhibicije, mora vrednost parametra biti večja ali enaka 0,3 (64). S tem parametrom smo določili predvsem inhibicijo preko vezave na molekulo DNA – tovrstni inhibitor je denimo huminska kislina (65).

Pri skeletu A je bil tako inhibiran zgolj en element, zgornja čeljustnica (IPC shift = 3,08) (*Preglednica VIII*). Noben izmed elementov skeleta B ni kazal prisotnosti inhibitorjev (*Preglednica IX*), medtem ko je pri skeletu C šlo za rahlo inhibicijo pri golenici (0,3) in intermedialni klinasti kosti (0,73) (*Preglednica X*). Kljub temu smo za golenico in intermedialno klinasto kost skeleta C uspeli pridobiti celoten DNA profil, pri zgornji čeljustnici skeleta A pa smo v postopku kvantifikacije zaznali le kratke fragmente DNA, dolgih pa ne, kar bi lahko bil poleg inhibicije vzrok temu, da tipizacija lokusov STR tega vzorca ni bila uspešna (število uspešno pomnoženih lokusov je bilo 7 ali manj).

Stopnjo degradacije smo ocenili s pomočjo razmerja količin avtosomskega (krajšega) in degradacijskega (daljšega) fragmenta v vzorcu – degradacijskega indeksa ($[Auto]/[D]$); višje razmerje $[Auto]/[D]$ (vrednosti večje od 2) ali celo popolna odsotnost degradacijskega fragmenta po PCR reakciji (slednje onemogoči določitev degradacijskega indeksa), nakazujejo na večjo degradiranost DNA - molekul v vzorcu.

Izmed vseh elementov skeleta A je bil najmanjši degradacijski indeks 3,45 (prsnica), največji pa 21,47 (dlančnica V). Degradacijskega indeksa ni bilo možno določiti pri sledečih elementih skeleta A: zgornja čeljustnica, črevnica, zgornji kočnik, spodnja čeljustnica, nadlahtnica, vratno vretence, ključnica, koželjnica, zatilnica, čelnica rebro XII., sednica, rebro VI., podlahtnica, temenica, zgornji sekalec II., lopatica, spodnji ličnik, spodnji kočnik, spodnji sekalec, spodnji podočnik, zgornji ličnik, zgornji podočnik. (*Preglednica VIII*)

Pri skeletu B je bil najmanjši degradacijski indeks 1,51 (zgornji podočnik), največji pa 20,82 (sramnica). Degradacijskega indeksa ni bilo možno določiti pri sledečih elementih skeleta B: ključnica, spodnji sekalec, zatilnica, čelnica, zgornji sekalec, spodnji ličnik, spodnji podočnik, zgornji ličnik, spodnji kočnik. (*Preglednica IX*)

Pri skeletu C je bil najmanjši degradacijski indeks 2,39 (stegnenica), največji pa 25,61 (lateralna klinasta kost). Degradacijskega indeksa ni bilo možno določiti pri sledečih elementih skeleta C: mečnica, spodnji podočnik, nadlahtnica, zgornji kočnik, čelnica, spodnji ličnik, zatilnica, ključnica, temenica, spodnji sekalec, zgornji sekalec, zgornji ličnik, zgornji podočnik, spodnji kočnik. (*Preglednica X*)

Vendar pa se za napoved uspeha genotipizacije degradacijski indeks v našem primeru ni izkazal za najbolj primerne – mnogim elementom z nižjo stopnjo degradacije smo namreč uspeli določiti le delne profile, medtem ko smo iz vzorcev z višjimi degradacijskimi indeksi uspeli pridobiti celotne profile. Hkrati pa smo iz vseh vzorcev skeletov A, B in C, pri katerih je bilo pomnoževanje degradacijskega fragmenta popolnoma neuspešno (46 od skupno 168 vzorcev), uspeli pridobiti delni profil le v dveh primerih (2/47) – zgornji kočnik skeleta A in spodnji sekalec skeleta B. V nobenem izmed vzorcev, kjer je bilo pomnoževanje degradacijskega fragmenta popolnoma neuspešno, nismo pridobili celotnega DNA profila. Slednja ugotovitev sovпада z rezultati raziskave, ki jo je na starih skeletnih elementih izvedla Zupanič Pajnič s sodelavci (92), pri čemer prihajajo do zaključkov, da pri vzorcih, pri katerih je bilo pomnoževanje degradacijskega (ali degradacijskega in avtosomskega) fragmenta popolnoma neuspešno, DNA profila, primerne za interpretacijo, ni bilo možno pridobiti (92).

Povprečna vrednost degradacijskih indeksov za vse vzorce, kjer smo ta parameter lahko določili, je bila $7,34 \pm 4,25$ s koeficientom variacije 57,9 %, kar kaže na to, da je DNA v naših vzorcih v splošnem precej razgrajena, kar je glede na starost skeletov in okolje, v katerem so se nahajali, pričakovano – pogoji, kot so denimo dostop kisika in vlage in prisotnost mikroorganizmov namreč neugodno vplivajo na ohranjenost DNA (2, 3, 4), medtem ko bi okolje s konstantno nizko temperaturo ugodno vplivalo na ohranitev molekule DNA (7). Hkrati pa nam koeficient variacije nakazuje, da je stopnja degradacije med vzorci različna.

Pomnoževanje IPC je bolj občutljivo na inhibitorje, kot pomnoževanje degradacijskega fragmenta, zato je ob visokem degradacijskem indeksu brez opaznega povišanja parametra »IPC shift« večja verjetnost prisotnosti degradirane DNA, kot pa prisotnost inhibitorjev v vzorcu (64). Tako degradacija, kot tudi inhibitorji, ovirajo ali celo onemogočijo analizo daljših alelov. Slednje smo opazili pri zgornji čeljustnici skeleta A, kjer nismo uspeli določiti degradacijskega indeksa, hkrati pa je bil IPC shift zelo povišan (3,08), v skladu s

tem pa tipizacija lokusov STR ni bila uspešna (uspešno pomnoženih je bilo manj kot 8 alelov). (*Preglednica VIII*)

V *Preglednicah VIII, IX in X* so prikazane povprečne vrednosti dupliciranih kvantifikacij za posamezni skeletni element. Z oznako HO smo v preglednicah označili navidezno homozigotnost, ki je posledica izpada enega alela na posameznem lokusu. Oznaka 17/17 (2xHO) tako denimo pomeni, da so aleli pomnoženi na vseh 17 preiskovanih lokusih, vendar je na dveh lokusih prišlo do izpada enega alela, zaradi česar imamo navidezno homozigotnost. Oznaka 15/17(3xHO) pomeni, da je pri dveh lokusih prišlo do izpada celotnega lokusa (pomnožil se ni noben alel na teh dveh lokusih), pri treh lokusih pa je prišlo do izpada enega alela, zato imamo navidezno homozigotnost. Tovrstno vrednotenje uspešnosti genotipizacije posameznih elementov smo omogočili tako, da smo najprej določili celoten profil STR za posameznega izmed treh skeletov s pomočjo skeletnih elementov, ki so bili pri tipizaciji lokusov STR najuspešnejši.

V **Preglednici VIII** so prikazani rezultati kvantifikacije in genotipizacije elementov skeleta A, razporejeni padajoče po degradacijskem indeksu. Prikazani so številka vzorca, ime elementa, količina avtosomskega fragmenta v ng na mikroliter vzorca, količina degradacijskega fragmenta v ng na mikroliter vzorca, razmerje med avtosomskim in degradacijskim fragmentom, število uspešno pomnoženih lokusov STR in IPC Shift.

Preglednica VIII: Rezultati kvantifikacije in genotipizacije skeleta A iz grobišča Huda jama.

Številka vzorca	ELEMENT SKELETA A	PQ Auto AVERAGE	PQ Deg AVERAGE	PQ [Auto]/[Deg] razmerje AVERAGE	STR ESSPLEX SEQS	PQ IPC Shift AVERAGE
442	DLANČNICA V.	0,1606	0,0074	21,47	17/17	-0,29
536	SENČNICA - SKALNICA	0,0725	0,004	17,99	17/17	-0,16
438	STOPALNICA IV.	0,5731	0,0406	14,13	17/17	-0,42
95	KRIŽNICA	0,0127	0,001	13,32	16/17	0,09
166	PROKS. PRSTNICA PALCA ROKE	0,0116	0,0009	12,9	16/17 (1XHO)	-0,32
440	DLANČNICA IV.	0,1345	0,0105	12,76	17/17	-0,41
94	KOCKA	0,0104	0,0008	12,48	16/17	-0,17
77	STOPALNICA V.	0,022	0,0018	11,97	17/17 (2XHO)	-0,68
439	DLANČNICA III.	0,2699	0,0227	11,91	17/17	-0,22

437	STOPALNICA II.	0,4816	0,0412	11,68	17/17	-0,33
441	DLANČNICA II.	0,2337	0,0209	11,19	17/17	-0,46
436	STOPALNICA III.	0,5974	0,0622	9,61	17/17	-0,4
83	KLINASTA KOST LATERAL	0,0122	0,0013	9,57	16/17	-0,8
412	STOPALNICA I.	0,0579	0,0061	9,54	17/17	-0,52
78	ČOLNIČ	0,0838	0,0101	8,26	17/17	-0,44
167	DIST. PRSTNICA PALCA ROKE	0,0839	0,0121	6,94	17/17 (1XHO)	-0,37
80	PROKS. PRSTNICA PALCA NOGE	0,033	0,0051	6,48	17/17	-0,67
84	SKOČNICA	0,0566	0,0088	6,46	17/17	-0,54
6	SRAMNICA	0,0063	0,001	6,45	16/17	-0,18
82	KLINASTA KOST MED.	0,0348	0,0055	6,37	16/17	-0,65
76	DLANČNICA I.	0,0849	0,0134	6,34	17/17 (1XHO)	-0,51
5	POGAČICA	0,1159	0,0184	6,3	17/17	-0,12
71	KLINASTA KOST INTERM.	0,224	0,0371	6,05	17/17	-0,32
74	GLAVATICA	0,2788	0,047	5,93	17/17	-0,46
73	DIST. PRSTNICA PALCA NOGE	0,1364	0,0233	5,86	17/17	-0,35
91	PETNICA	0,0206	0,0035	5,8	16/17	-0,47
85	REBRO I.	0,0034	0,0006	5,69	11/17 (2XHO)	-0,84
11	STEGNENICA	0,0029	0,0006	5,18	15/17 (5xHO)	-0,5
1	MECNICA	0,0066	0,0013	5,15	15/17	-0,26
2	GOLENICA	0,0114	0,0025	4,53	17/17 (1XHO)	-0,14
89	LEDVENO VRETENCE	0,0101	0,0024	4,25	16/17	-0,68
90	PRSNNO VRETENCE	0,0121	0,0029	4,22	14/17 (2XHO)	-0,6
87	PRSNICA	0,0021	0,0006	3,45	12/17 (3XHO)	-0,75
96	ZG. ČELJUSTNICA	0,0028	/	nedoločeno	< 8 lokusov	3,08
88	ČREVNICA	0,0011	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,4
99	ZG. KOČNIK	0,001	/	nedoločeno	12/17 (5XHO)	-0,2
179	SP. ČELJUSTNICA	0,001	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,49
13	NADLAHTNICA	0,0006	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,47
93	VRATNO	0,0006	/	nedoločeno	< 8	-0,41

	VRETENCE				lokusov	
4	KLJUČNICA	0,0004	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,34
12	KOŽELJNICA	0,0003	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,45
7	ZATILNICA	0,0003	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,53
75	ČELNICA	0,0003	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,73
86	REBRO XII.	0,0003	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,74
178	SEDNICA	0,0003	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,73
3	REBRO VI.	0,0002	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,35
10	PODLAHTNICA	0,0002	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,5
72	TEMENICA	0,0002	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,66
107	ZG. SEKALEC II.	0,0002	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,67
14	LOPATICA	0,0001	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,41
101	SP. LIČNIK	/	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,54
103	SP. KOČNIK	/	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,28
104	SP. SEKALEC	/	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,63
105	SP. PODOČNIK	/	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,54
106	ZG. LIČNIK	/	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,49
108	ZG. PODOČNIK	/	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,61

V **Preglednici IX** so prikazani rezultati kvantifikacije in genotipizacije elementov skeleta B, razporejeni padajoče po degradacijskem indeksu. Prikazani so številka vzorca, ime elementa, količina avtosomskega fragmenta v ng na mikroliter vzorca, količina degradacijskega fragmenta v ng na mikroliter vzorca, razmerje med avtosomskim in degradacijskim fragmentom, število uspešno pomnoženih lokusov STR in IPC Shift.

Preglednica IX: Rezultati kvantifikacije in genotipizacije skeleta B iz grobišča Huda jama.

Številka vzorca	ELEMENT SKELETA B	PQ Auto AVERAGE	PQ Deg AVERAGE	PQ [Auto]/[Deg] razmerje AVERAGE	STR ESSPLEX SEQS	PQ IPC Shift AVERAGE
57	SRAMNICA	0,0079	0,0004	20,82	13/17 (1XHO)	-0,43
177	REBRO XII.	0,0063	0,0003	19,42	16/17 (4XHO)	-0,72
195	ZG. KOČNIK	0,0094	0,0007	14,36	17/17 (2XHO)	-0,2
56	SEDNICA	0,0046	0,0004	11,54	15/17 (1XHO)	-0,52
443	DLANČNICA III.	0,4183	0,0381	10,99	17/17	-0,42
41	DIST. PRSTNICA PALCA ROKE	0,0902	0,0089	10,17	16/17	-0,03
65	DLANČNICA V.	0,0072	0,0008	9,16	17/17	-0,36
37	DIST. PRSTNICA PALCA NOGE	0,0969	0,0117	8,3	17/17	0,07
18	GOLENICA	0,0151	0,0018	8,25	17/17 (3XHO)	-0,53
64	VRATNO VRETENCE	0,0459	0,0056	8,24	17/17 (1XHO)	-0,19
21	PODLAHTNICA	0,0014	0,0002	8,1	< 8 lokusov	-0,44
54	KRIŽNICA	0,0079	0,0010	7,95	11/17 (3XHO)	-0,28
51	STOPALNICA IV.	0,0073	0,0010	7,48	17/17 (3XHO)	-0,5
49	STOPALNICA II.	0,0131	0,0018	7,42	17/17	-0,22
62	LOPATICA	0,0014	0,0002	7,28	13/17 (3XHO)	-0,62
537	SENČNICA - SKALNICA	0,078	0,0111	7,05	17/17	-0,46
35	GLAVATICA	0,0353	0,0053	6,69	17/17	-0,57
50	STOPALNICA III.	0,085	0,0142	5,97	17/17	-0,18
15	MEČNICA	0,012	0,0022	5,38	16/17	-0,48
38	KLINASTA KOST INTERM.	0,0515	0,0099	5,2	17/17	-0,13
28	KOŽELJNICA	0,0017	0,0003	5,18	14/17 (1XHO)	-0,42
48	DLANČNICA IV.	0,0215	0,0044	4,88	17/17	-0,13
70	KLINASTA KOST MED.	0,2213	0,0457	4,85	17/17	-0,19
39	KLINASTA KOST LATERAL.	0,0948	0,0197	4,82	17/17	-0,23
27	SP. ČELJUSTNICA	0,0009	0,0002	4,8	< 8 lokusov	-0,15
61	PRSNICA	0,0388	0,0083	4,67	17/17	-0,48

32	KOCKA	0,061	0,0132	4,64	17/17	-0,31
63	REBRO VI.	0,0023	0,0005	4,6	14/17	-0,36
52	STOPALNICA V.	0,1183	0,0258	4,59	17/17 (1XHO)	-0,18
34	POGAČICA	0,1235	0,0276	4,48	17/17	0,02
31	SKOČNICA	0,1857	0,0427	4,35	17/17	-0,18
33	PROKS. PRSTNICA PALCA NOGE	0,0794	0,0186	4,27	17/17	-0,05
53	DLANČNICA II.	0,1031	0,0252	4,09	17/17	-0,21
67	DLANČNICA I.	0,1668	0,041	4,07	17/17	-0,23
17	STOPALNICA I.	0,4021	0,1005	4	17/17	-0,04
58	PRSNO VRETNICE	0,137	0,0347	3,95	17/17	-0,67
69	ZG. ČELJUSTNICA	0,0126	0,0032	3,95	17/17 (1XHO)	-0,3
59	LEDVENO VRETNICE	0,0908	0,0242	3,75	17/17	-0,33
55	ČREVNICA	0,0413	0,011	3,75	17/17 (1XHO)	-0,42
19	PROKS. PRSTNICA PALCA ROKE	0,2918	0,0796	3,67	17/17	-0,23
30	ČOLNIČ	0,0731	0,0201	3,63	17/17	0,08
36	PETNICA	0,1399	0,04	3,5	17/17	-0,27
20	STEGNENICA	0,0113	0,0034	3,37	17/17	-0,35
22	NADLAHTNICA	0,0021	0,0006	3,29	15/17 (1XHO)	-0,12
29	REBRO I.	0,0281	0,0097	2,9	17/17 (1XHO)	-0,36
25	TEMENICA	0,0004	0,0002	1,72	< 8 lokusov	-0,39
44	ZG. PODOČNIK	0,0002	0,0001	1,51	< 8 lokusov	-0,49
60	KLJUČNICA	0,0011	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,43
45	SP. SEKALEC	0,001	/	nedoločeno	9/17	-0,63
24	ČELNICA	0,0006	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,14
26	ZATILNICA	0,0004	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,24
43	ZG. SEKALEC	0,0001	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,31
42	SP. LIČNIK	/	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,36
46	SP. PODOČNIK	/	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,28
47	ZG. LIČNIK	/	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,22

169	SP. KOČNIK	/	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,71
-----	------------	---	---	------------	----------------	-------

V **Preglednici X** so prikazani rezultati kvantifikacije in genotipizacije elementov skeleta C, razporejeni padajoče po degradacijskem indeksu. Prikazani so številka vzorca, ime elementa, količina avtosomskega fragmenta v ng na mikroliter vzorca, količina degradacijskega fragmenta v ng na mikroliter vzorca, razmerje med avtosomskim in degradacijskim fragmentom, število uspešno pomnoženih lokusov STR in IPC Shift.

Preglednica X: Rezultati kvantifikacije in genotipizacije skeleta C iz grobišča Huda jama.

Vzo rec	VRSTA ELEMENTA SKELET C	PQ Auto AVERAGE	PQ Deg AVERAGE	PQ Auto/Deg razmerje AVERAGE	STR ESSPLEX SEQS	PQ IPC Shift AVERAGE
145	KLINASTA KOST LAT.	0,0157	0,0006	25,61	16/17 (1XHO)	-0,78
444	STOPALNICA IV.	0,164	0,0101	16,2	17/17 (2XHO)	-0,31
160	DLANČNICA I.	0,007	0,0005	14,04	17/17 (1XHO)	-0,02
149	DIST. PRSTNICA PALCA NOGE	0,0365	0,003	12,27	17/17 (2XHO)	-0,87
445	STOPALNICA III.	0,0702	0,0061	11,6	17/17 (1XHO)	-0,25
532	PROKS. PRSTNICA PALCA ROKE	0,0612	0,0053	11,45	17/17	-0,38
134	SEDNICA	0,0026	0,0002	10,47	17/17 (5XHO)	-0,51
147	PETNICA	0,0069	0,0007	9,88	16/17 (2XHO)	-1,14
448	DLANČNICA II.	0,0244	0,0025	9,75	17/17 (2XHO)	-0,82
450	DLANČNICA IV.	0,3739	0,0392	9,54	17/17 (1XHO)	-0,31
136	REBRO VI.	0,0023	0,0002	9,4	< 8 lokusov	-0,86
446	STOPALNICA II.	0,1437	0,0169	8,52	17/17 (1XHO)	-0,31
139	ČREVNICA	0,0034	0,0004	8,15	16/17 (2XHO)	-0,94
138	VRATNO VRETENCE	0,0038	0,0005	7,75	16/17 (3XHO)	-0,93
180	KLINASTA KOST INTERM.	0,0165	0,0022	7,51	17/17 (1XHO)	0,73
137	LEDVENO	0,0031	0,0004	7,49	12/17	-0,7

	VRETENCE				(2XHO)	
451	DLANČNICA V.	0,2842	0,038	7,48	17/17 (1XHO)	-0,42
152	GLAVATICA	0,0114	0,0015	7,46	16/17	-0,95
154	KOCKA	0,0071	0,001	7,41	16/17	-0,98
127	SP. ČELJUSTNICA	0,0078	0,0011	7,19	17/17 (1XHO)	-0,27
146	POGAČICA	0,022	0,0031	7,08	16/17 (1XHO)	-0,99
413	STOPALNICA I.	0,0295	0,0044	6,75	17/17 (1XHO)	-0,93
148	PROKS. PRSTNICA.PALCA NOGE	0,0106	0,0016	6,43	16/17	-0,95
447	STOPALNICA V.	0,0857	0,0136	6,32	17/17	-0,45
150	DIST.PRSTNICA PALCA ROKE	0,0091	0,0015	6,28	16/17 (1XHO)	-1,2
538	SENČNICA - SKALNICA	0,1791	0,029	6,18	17/17	-0,39
449	DLANČNICA III.	0,2523	0,0437	5,77	17/17 (1XHO)	-0,34
140	SRAMNICA	0,0038	0,0007	5,38	16/17 (4XHO)	-0,92
165	ZG. ČELJUSTNICA	0,0064	0,0012	5,17	16/17 (2XHO)	-0,24
143	PRSNO VRETENCE	0,0085	0,0017	5,04	17/17 (2XHO)	-0,9
135	REBRO I.	0,0096	0,0021	4,63	17/17 (1XHO)	-0,5
144	KLINASTA KOST MED.	0,0323	0,0076	4,24	17/17	-0,76
182	PRSNICA	0,0069	0,0018	3,94	15/17 (4XHO)	-0,86
156	KRIŽNICA	0,0061	0,0017	3,59	17/17	-0,7
128	GOLENICA	0,0446	0,0143	3,12	17/17 (1XHO)	0,3
141	SKOČNICA	0,0069	0,0022	3,07	17/17	-0,87
153	ČOLNIČ	0,0062	0,0022	2,8	16/17 (1XHO)	-1,01
122	LOPATICA	0,0004	0,0002	2,75	< 8 lokusov	-0,55
125	KOŽELJNICA	0,0005	0,0002	2,64	< 8 lokusov	-0,28
142	REBRO XII.	0,0007	0,0003	2,58	< 8 lokusov	-0,98
124	PODLAHTNICA	0,0005	0,0002	2,58	< 8 lokusov	-0,25
121	STEGNENICA	0,0064	0,0027	2,39	16/17 (2XHO)	-0,34

181	MEČNICA	0,0022	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,69
172	SP. PODOČNIK	0,0006	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,37
133	NADLAHTNICA	0,0006	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,65
174	ZG. KOČNIK	0,0005	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,7
129	ČELNICA	0,0005	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,17
171	SP. LIČNIK	0,0004	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,63
123	ZATILNICA	0,0001	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,64
130	KLJUČNICA	0,0001	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,01
131	TEMENICA	0,0001	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,1
110	SP. SEKALEC	0,0001	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,44
111	ZG. SEKALEC	/	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,65
109	ZG. LIČNIK	/	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,7
170	ZG. PODOČNIK	/	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,65
175	SP. KOČNIK	/	/	nedoločeno	< 8 lokusov	-0,72

Najuspešnejših 20 elementov povprečno pri vseh treh skeletih

Z medsebojno primerjavo in razvrščanjem različnih skeletnih elementov glede na povprečno količino DNA v ng na g kosti oziroma zoba v skeletih A, B in C (uporabili smo vrednost kvantifikacije kratkega fragmenta), smo ugotovili, da so med prvimi dvajsetimi elementi po tem kriteriju izključno kosti rok in nog, izmed katerih smo najboljše rezultate pridobili iz stopalnic (I, II, III, IV) in dlančnic (II, III, IV, V), ki predstavljajo prvih 8 elementov s povprečno največ DNA v ng na g kosti oziroma zoba v posameznem elementu za tri preiskovane skelete. Dlančnica III, ki je imela v skeletih A, B in C povprečno največjo količino DNA v ng/g kosti oziroma zoba, je posamično v skeletu A glede na količino DNA uvrščena na 15., pri skeletu B na 18. in pri skeletu C na 3. mesto. Iz zob smo povprečno pridobili najmanj DNA in le en celoten profil (zgornji kočnik, skelet B), kar je glede na druge raziskave zelo presenetljivo, saj bi se v zobeh DNA morala dobro in dolgo ohranjati (22, 27). Poleg zob so povprečno nizko količino DNA (ng/g kosti oziroma

zoba) imele tudi temenica, zatilnica, čelnica, lopatica in ključnica (*Preglednice VIII, IX, X, XI, Slika 11*).

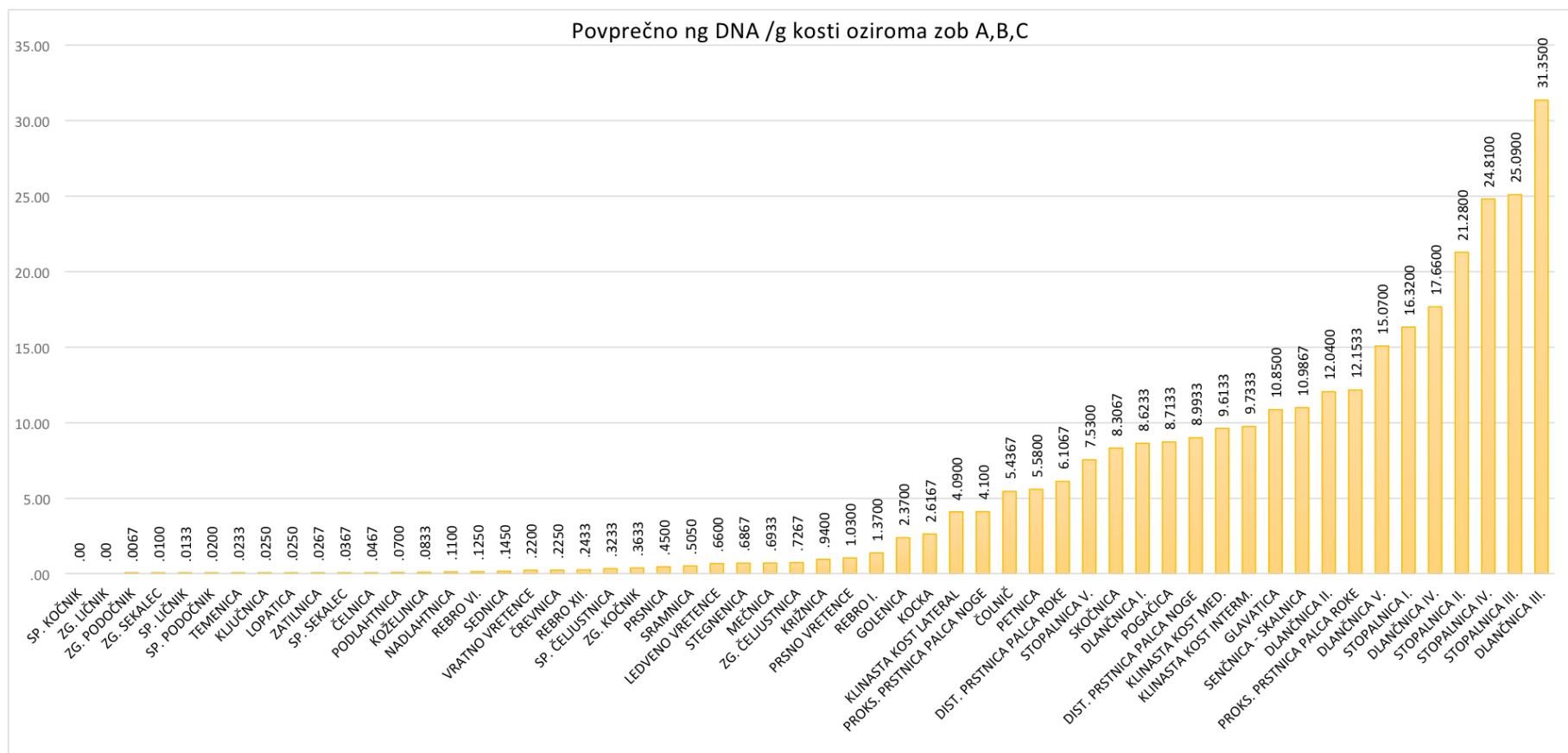
V **Preglednici XI** so prikazane vrste skeletnih elementov, povprečna količina DNA v ng na g kosti oziroma zob, število celotnih profilov in povprečno število pomnoženih lokusov v treh preiskovanih skeletih. Za izračun povprečne količine ng DNA na g kosti oz. zoba smo uporabili rezultate kvantifikacije kratkega (avtosomskega) fragmenta.

Preglednica XI: Povprečna količina DNA v ng/g kosti oziroma zob, število celotnih profilov in povprečno število pomnoženih lokusov za posamezni element v vseh treh skeletih.

<i>Vrsta skeletnega elementa</i>	<i>Povprečno ng DNA /g kosti oz. zoba A,B,C</i>	<i>Število polnih profilov</i>	<i>Povprečno število pomnoženih STR lokusov</i>
DLANČNICA III.	31,4	3/3	17
STOPALNICA III.	25,1	3/3	17
STOPALNICA IV.	24,8	3/3	17
STOPALNICA II.	21,3	3/3	17
DLANČNICA IV.	17,7	3/3	17
STOPALNICA I.	16,3	3/3	17
DLANČNICA V.	15,1	3/3	17
PROKS. PRSTNICA PALCA ROKE	12,2	2/3	16,7
DLANČNICA II.	12,0	3/3	17
SENČNICA – SKALNICA	11,0	3/3	17
GLAVATICA	10,9	2/3	16,7
KLINASTA KOST INTERM.	9,7	3/3	17
KLINASTA KOST MED.	9,6	2/3	16,7
DIST. PRSTNICA PALCA NOGE	9,0	3/3	17
POGAČICA	8,7	2/3	16,7
DLANČNICA I.	8,6	3/3	17
SKOČNICA	8,3	3/3	17
STOPALNICA V.	7,5	3/3	17
DIST. PRSTNICA PALCA ROKE	6,1	1/3	16,3
PETNICA	5,6	1/3	16,3
ČOLNIČ	5,4	2/3	16,7
PROKS. PRSTNICA PALCA NOGE	4,1	2/3	16,7
KLINASTA KOST LATERAL	4,1	1/3	16,3
KOCKA	2,6	1/3	16,3
GOLENICA	2,4	3/3	17
REBRO I.	1,4	2/3	15
PRSNO VRETENCE	1,0	2/3	16
KRIŽNICA	0,9	1/3	14,7
ZG. ČELJUSTNICA	0,7	1/3	13,3
MEČNICA	0,7	0/3	12,7
STEGNENICA	0,7	1/3	16

LEDVENO VRETENCE	0,7	1/3	15
SRAMNICA	0,5	0/3	15
PRSNICA	0,5	1/3	14,7
ZG. KOČNIK	0,4	1/3	12
SP. ČELJUSTNICA	0,3	1/3	10,3
REBRO XII.	0,2	0/3	10
ČREVNICA	0,2	1/3	13,3
VRATNO VRETENCE	0,2	1/3	13,3
SEDNICA	0,1	1/3	13
REBRO VI.	0,1	0/3	9,3
NADLAHTNICA	0,1	0/3	9,7
KOŽELJNICA	0,1	0/3	9,3
PODLAHTNICA	0,1	0/3	7
ČELNICA	0,0	0/3	7
SP. SEKALEC	0,0	0/3	7,7
ZATILNICA	0,0	0/3	7
KLJUČNICA	0,0	0/3	7
LOPATICA	0,0	0/3	9
TEMENICA	0,0	0/3	7
SP. PODOČNIK	0,0	0/3	7
SP. LIČNIK	0,0	0/3	7
ZG. SEKALEC	0,0	0/3	7
ZG. PODOČNIK	0,0	0/3	7
SP. KOČNIK	0,0	0/3	7
ZG. LIČNIK	0,0	0/3	7

Na **Sliki 11** so prikazane posamezne vrste skeletnih elementov naraščajoče po povprečni količini DNA v ng/g kosti oziroma zoba v vseh treh skeletih. Pri vseh treh skeletih povprečno so se med najboljše elemente glede na ng DNA na g kosti oz. zoba uvrstile skorajda izključno kosti rok in nog - stopalnice in dlančnice ter proksimalna prstnica palca roke – ter senčnica; omenjene kosti predstavljajo 10 najvišje uvrščenih. Med najslabše uvrščenimi so zobje. Količino DNA v ng predstavljajo rezultati kvantifikacije krajšega, avtosomskega fragmenta DNA. Os x prikazuje imena posameznih skeletnih elementov, os y pa povprečno količino DNA v ng na g kosti oziroma zob v skeletih A, B in C. Kvantifikacijo smo izvedli s kompletom PowerQuant™ System (Promega).



Slika 11: Skeletni elementi naraščajoče razvrščeni glede na povprečno količino DNA (ng/g kosti oziroma zoba) v vseh treh skeletih.

REZULTATI GENOTIPIZACIJE LOKUSOV STR

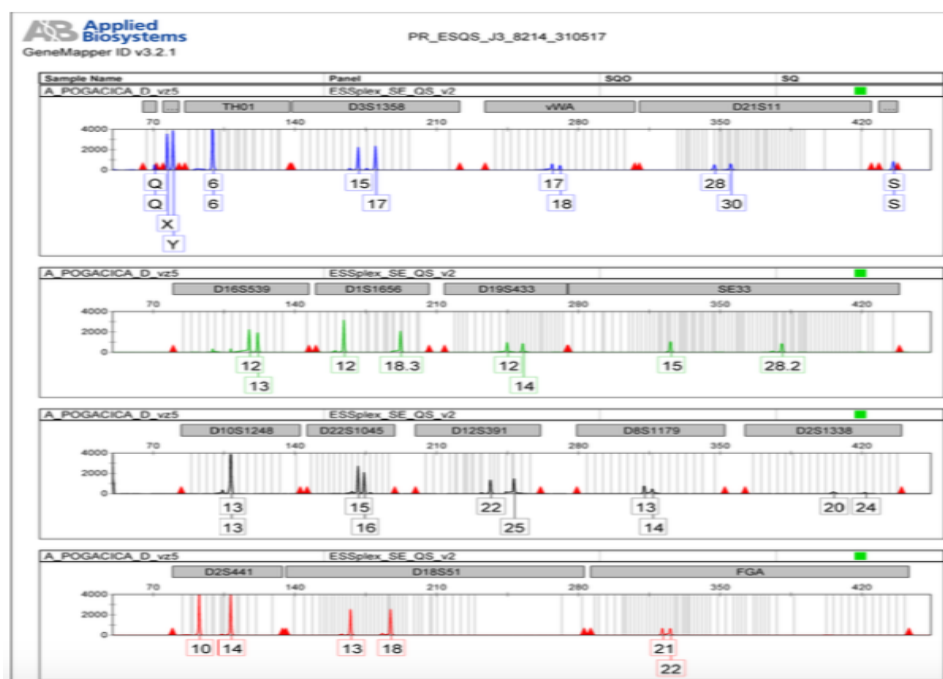
Za genotipizacijo vzorcev iz grobišča Huda jama smo uporabili že opisan komplet ESSplex SE QS (Qiagen), s katerim smo pomnoževali področja STR avtosomske DNA in odsek amelogeninskega gena – skupno 17 področij.

ELEKTROFEROGRAMI

Izbrali smo nekatere elektroferograme skeletov A, B in C za prikaz različno uspešnih amplifikacij in pridobitve genetskih profilov (celotni profili, delni profili (profili z izpadi celih lokusov in profili z navideznimi homozigotnimi stanji na posameznih lokusih STR) in profili neprimerni za interpretacijo (ti imajo pomnoženih manj kot 8 lokusov STR). Na elektroferogramu vsak izmed vrhov pripada enemu izmed analiziranih alelov, višina vrhov pa prikazuje intenziteto fluorescence v relativnih enotah fluorescence (RFU) (os y). Z osi x razberemo dolžino DNA - fragmentov in oznako lokusov, ki jim preiskovani aleli pripadajo, številke pod osjo pa prikazujejo število ponovitev osnovnega motiva za posamezni alel.

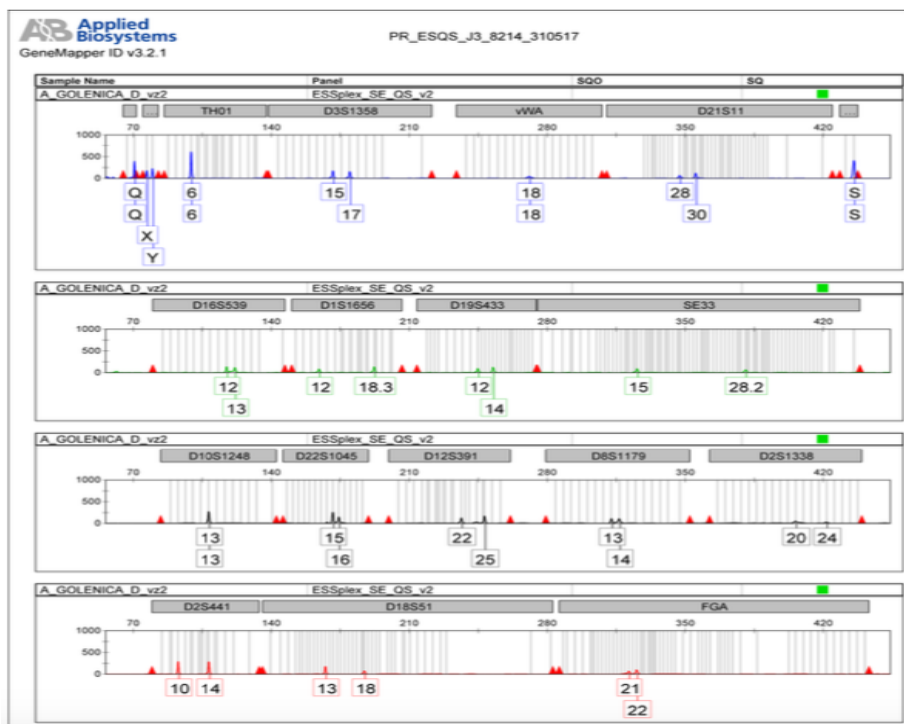
SKELET A

Slika 12 prikazuje elektroferogram skeleta A, vzorec 5, pogačica, pri katerem so uspešno pomnoženi vsi tarčni lokusi (17/17), prikazan je celoten profil skeleta A.



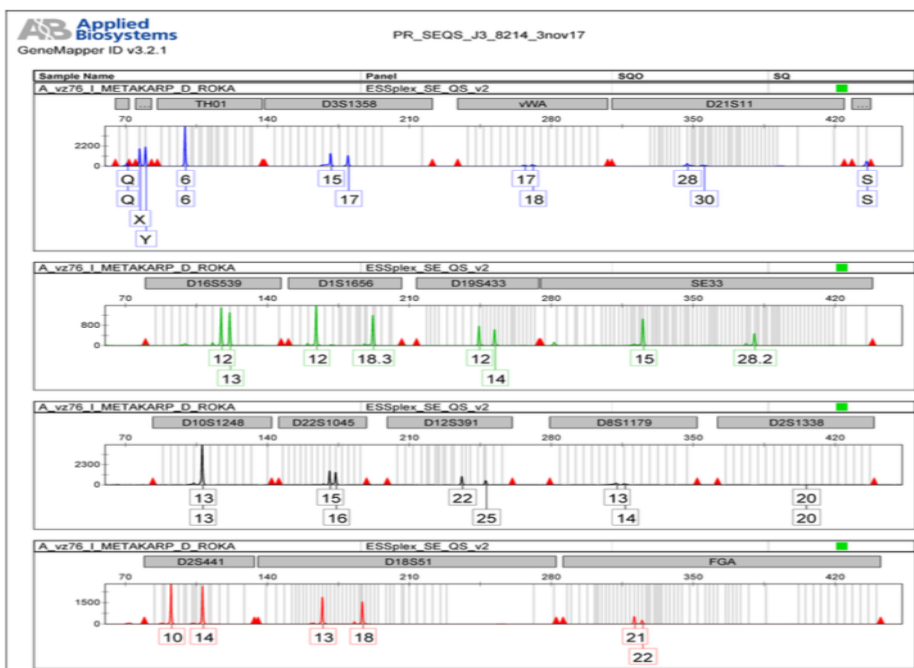
Slika 12: Elektroferogram skeleta A, vzorec 5, pogačica, 17/17.

Slika 13 prikazuje elektroferogram skeleta A, vzorec 2, golenica, pri katerem so uspešno pomnoženi vsi tarčni lokusi (17/17); na lokusu vWA je prisotna navidezna homozigotnost.



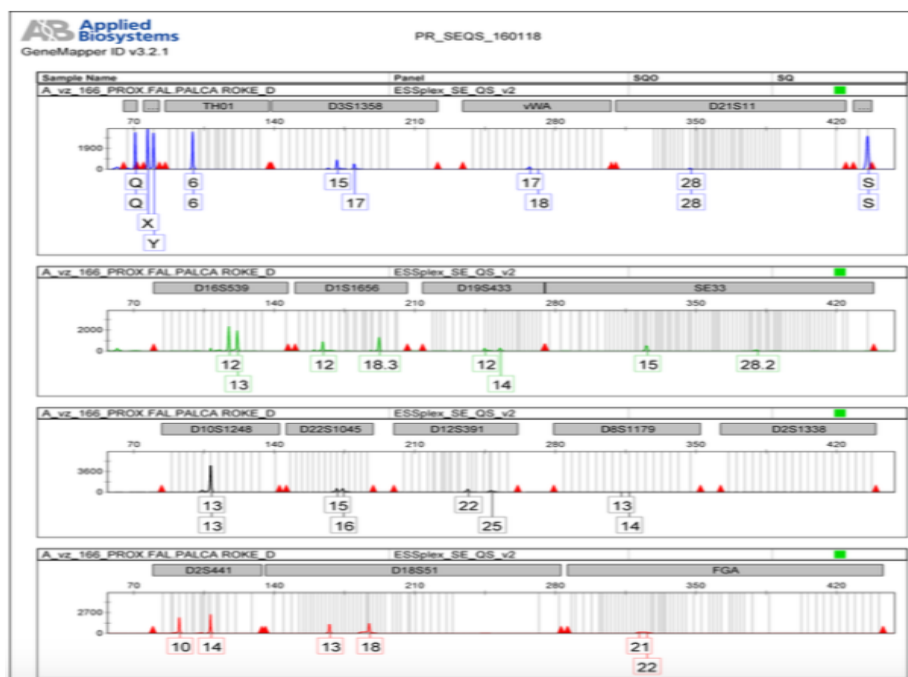
Slika 13: Elektroferogram skeleta A, vzorec 2, golenica, 17/17.

Slika 14 prikazuje elektroferogram skeleta A, vzorec 76, dlančnica, pri katerem so uspešno pomnoženi vsi tarčni lokusi (17/17); na lokusu D2S1338 je prisotna navidezna homozigotnost.



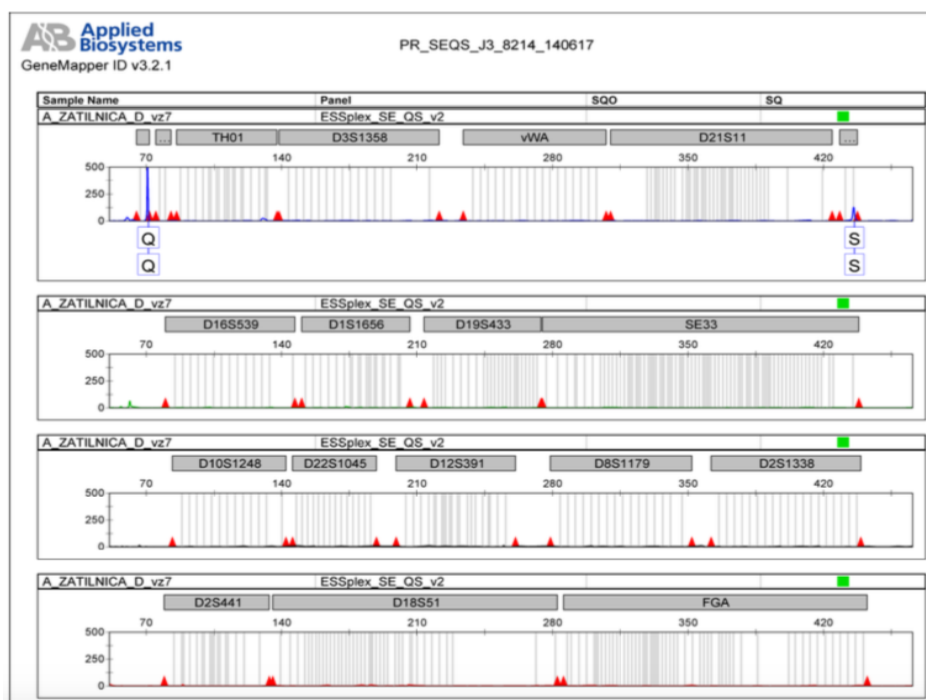
Slika 14: Elektroferogram skeleta A, vzorec 76, dlančnica I, 17/17.

Slika 15 prikazuje elektroferogram skeleta A, vzorec 166, proksimalna prstnica palca roke, pri katerem je uspešno pomnoženih 16/17 tarčnih odsekov; na lokusu D21S11 je prisotna navidezna homozigotnost, prikazan je delni profil skeleta A.



Slika 15: Elektroferogram skeleta A, vzorec 166, proks. prstnica palca roke, 16/17.

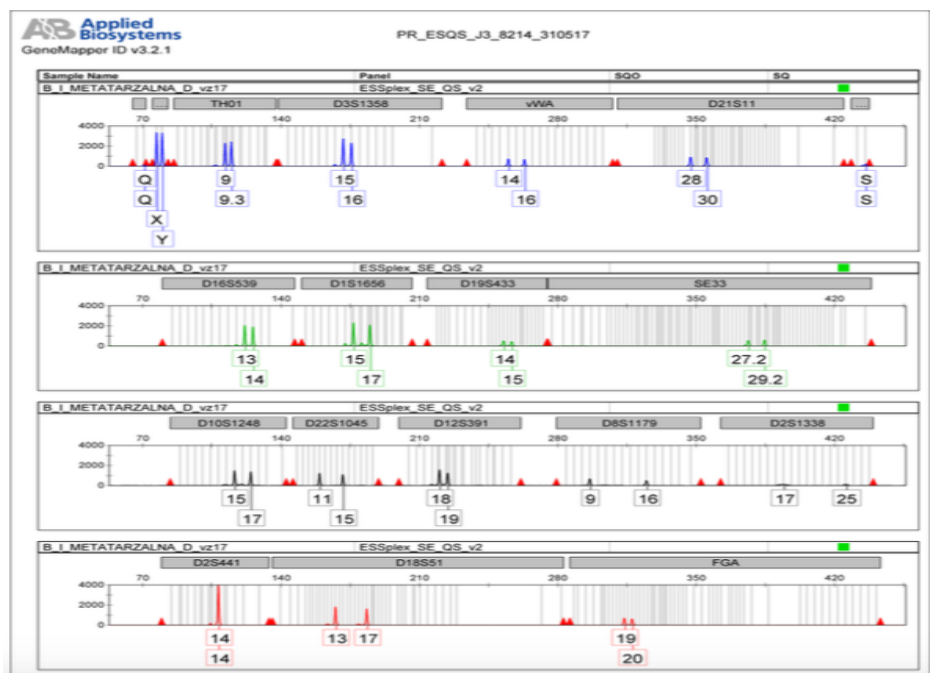
Slika 16 prikazuje elektroferogram skeleta A, vzorec 7, zatilnica, pri katerem je uspešno pomnoženih manj kot 8 lokusov; profil ni primeren za interpretacijo.



Slika 16: Elektroferogram skeleta A, vzorec 7, zatilnica, < 8 lokusov.

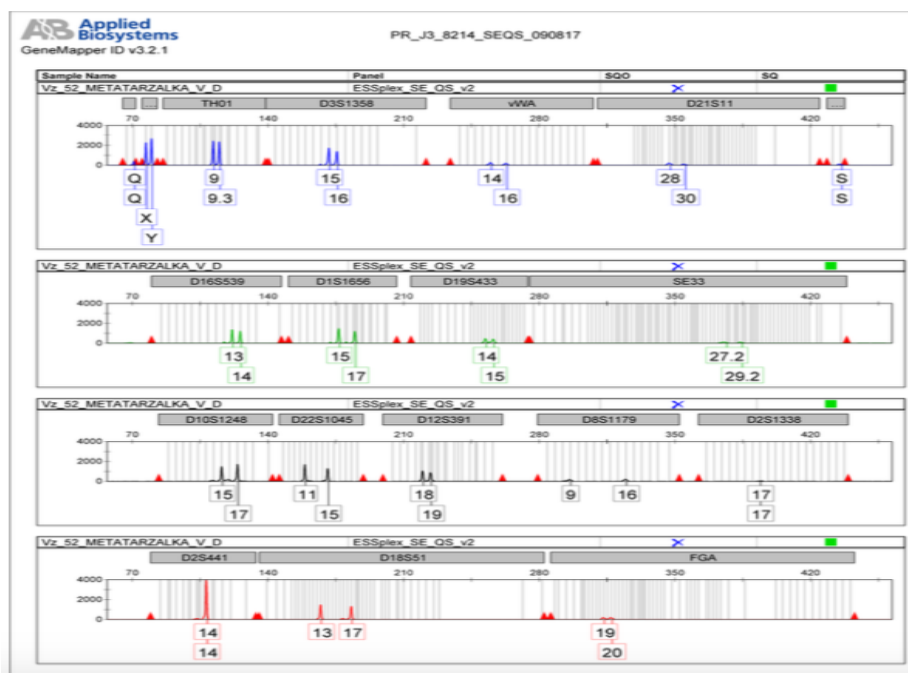
SKELET B

Slika 17 prikazuje elektroferogram skeleta B, vzorec 17, stopalnica I, pri katerem so uspešno pomnoženi vsi tarčni odseki (17/17). Prikazan je celoten profil skeleta B.



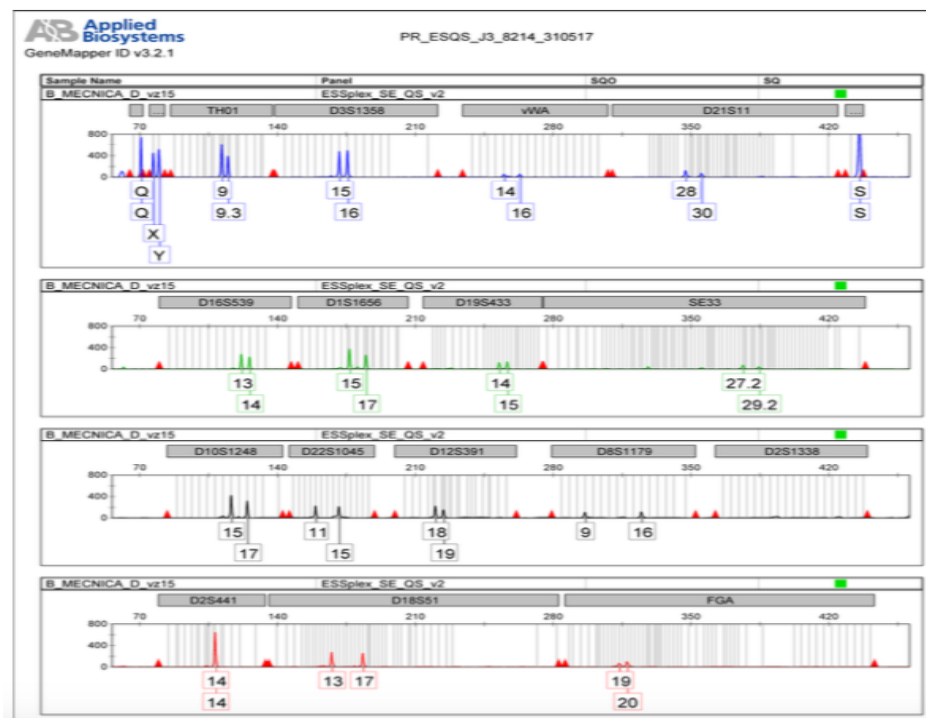
Slika 17: Elektroferogram skeleta B, vzorec 17, stopalnica I, 17/17.

Slika 18 prikazuje elektroferogram skeleta B, vzorec 52, stopalnica V, pri katerem so uspešno pomnoženi vsi tarčni odseki; na lokusu D2S1338 je prisotna navidezna homozigotnost.



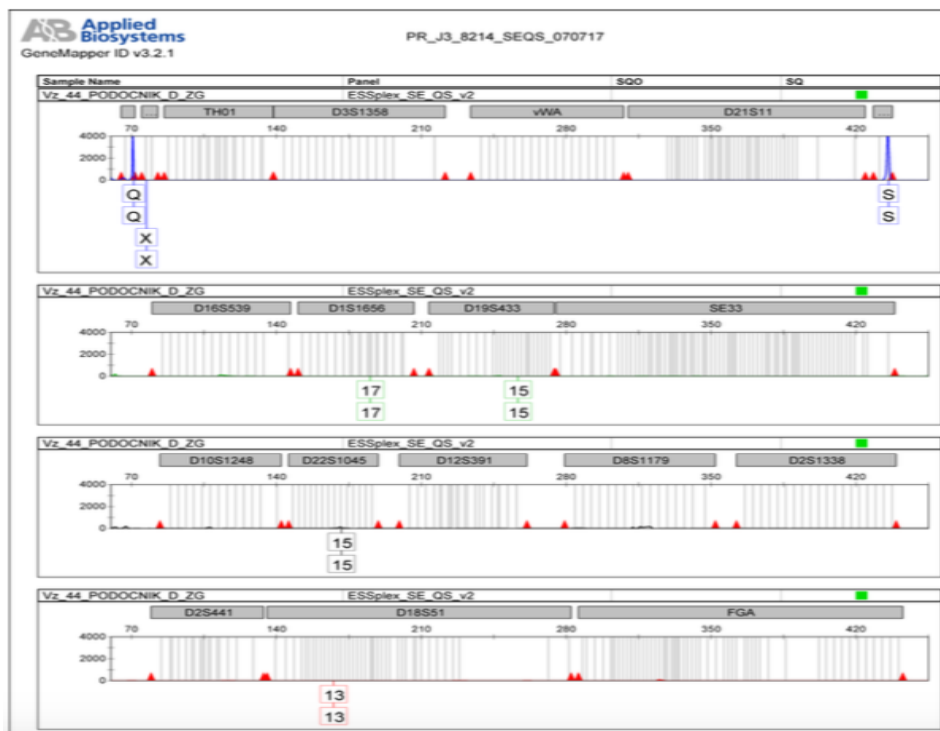
Slika 18: Elektroferogram skeleta B, vzorec 52, stopalnica V, 17/17.

Slika 19 prikazuje elektroferogram skeleta B, vzorec 15, mečnica, pri katerem je uspešno pomnoženih 16/17 lokusov; prikazan je delni profil skeleta B.



Slika 19: Elektroferogram skeleta B, vzorec 15, mečnica, 16/17.

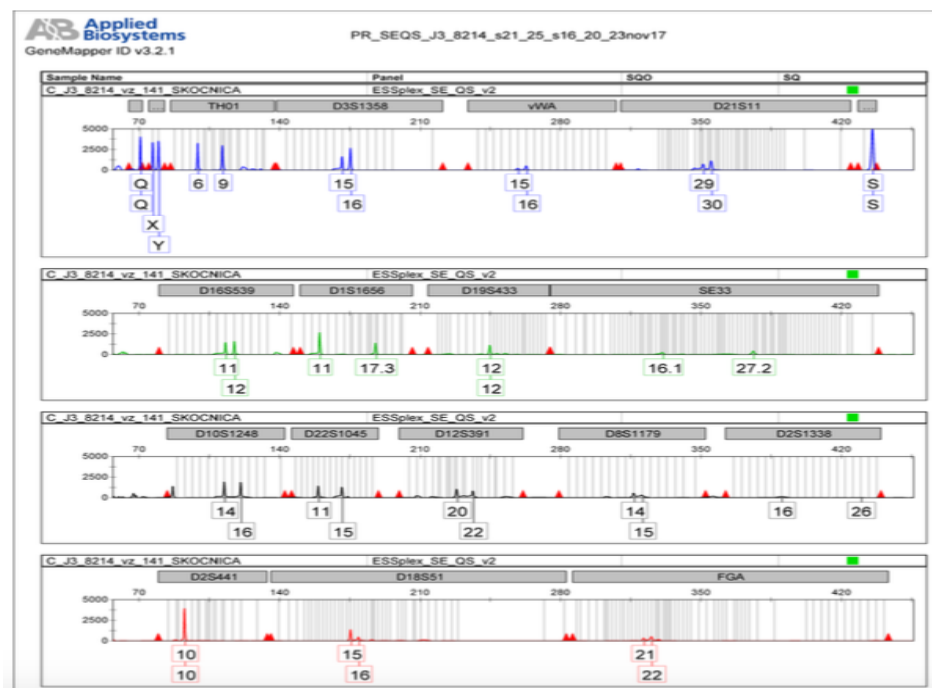
Slika 20 prikazuje elektroferogram skeleta B, vzorec 44, zgornji podočnik, pri katerem je uspešno pomnoženih manj kot 8 lokusov, profil ni primeren za interpretacijo.



Slika 20: Elektroferogram skeleta B, vzorec 44, zgornji podočnik, < 8 lokusov.

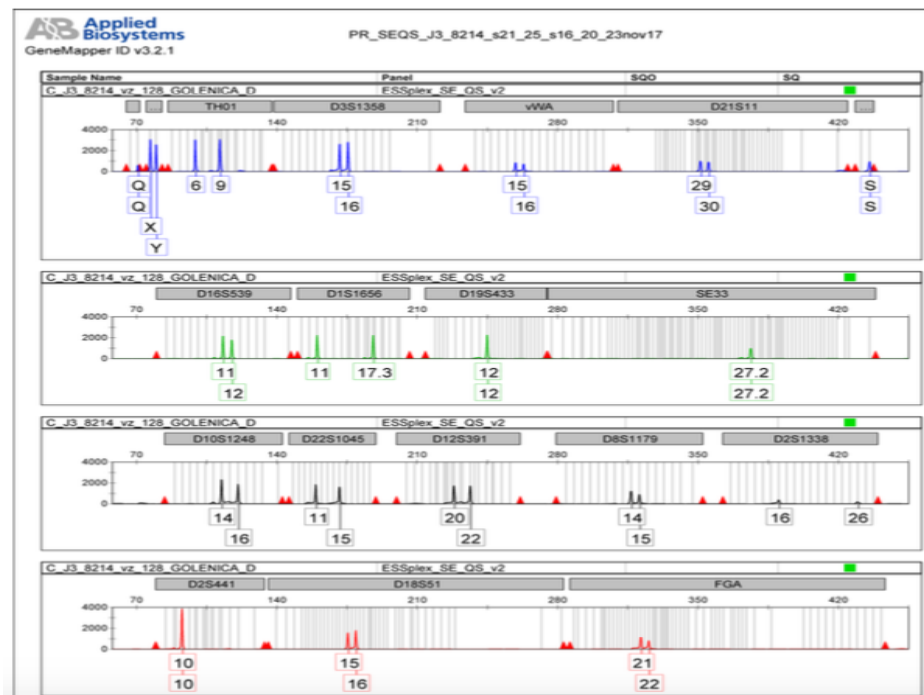
SKELET C

Slika 21 prikazuje elektroferogram skeleta C, vzorec 141, skočnica, uspešno so pomnoženi vsi lokusi (17/17). Prikazan je celoten profil skeleta C.



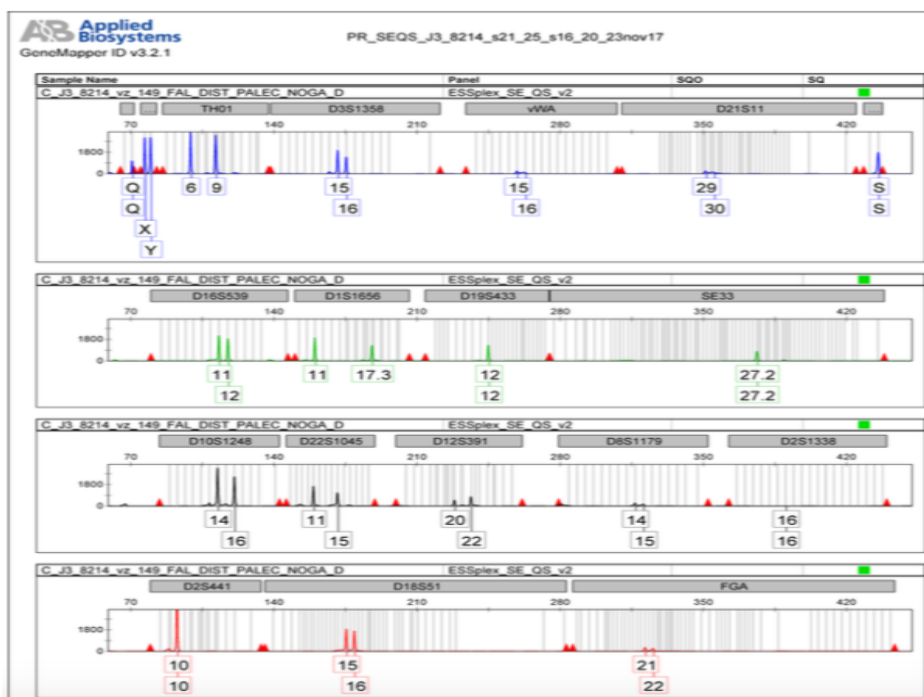
Slika 21: Elektroferogram skeleta C, vzorec 141, skočnica, 17/17.

Slika 22 prikazuje elektroferogram skeleta C, vzorec 128, golenica, uspešno je pomnoženih 17/17 lokusov; na lokusu SE33 je prisotna navidezna homozigotnost.



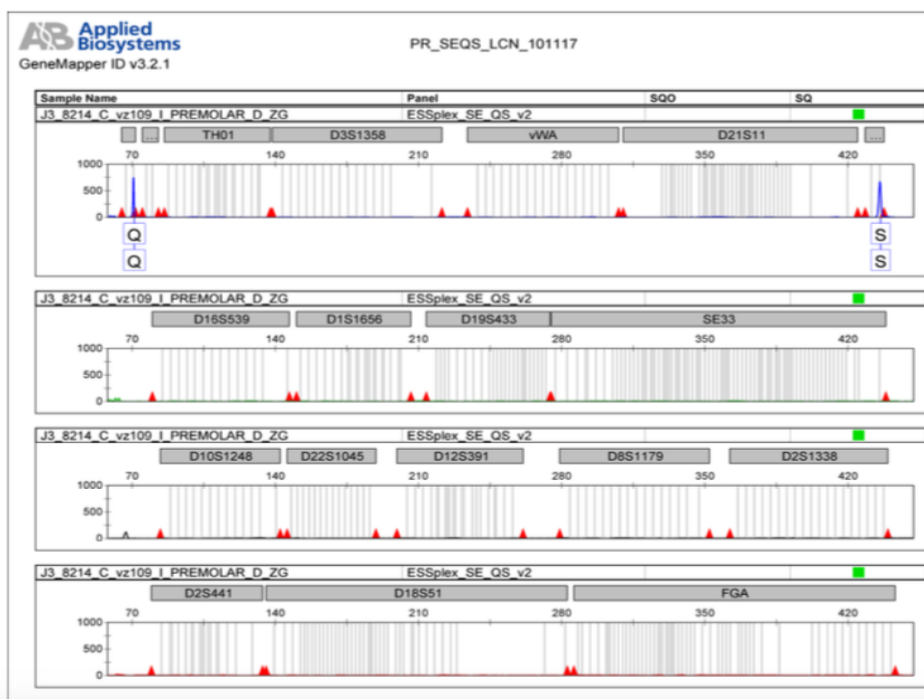
Slika 22: Elektroferogram skeleta C, vzorec 128, golenica, 17/17.

Slika 23 prikazuje elektroferogram skeleta C, vzorec 149, distalna prstnica palca noge, uspešno je pomnoženih 17/17 lokusov; na lokusih D2S1338 in SE33 je prisotna navidezna homozigotnost.



Slika 23: Elektroferogram skeleta C, vzorec 149, distalna prstnica palca noge, 17/17.

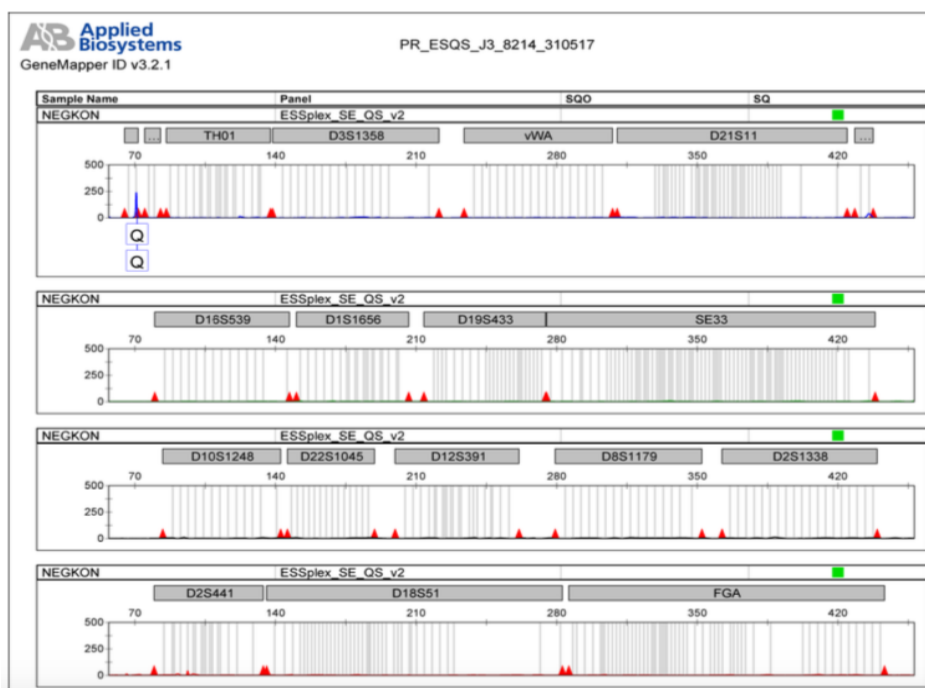
Slika 24 prikazuje elektroferogram skeleta C, vzorec 109, zgornji ličnik, uspešno je pomnoženih manj kot 8 lokusov, dobljen profil ni primeren za interpretacijo.



Slika 24: Elektroferogram skeleta C, vzorec 109, zgornji ličnik, < 8 lokusov.

NEGATIVNA KONTROLA REAKCIJE PCR

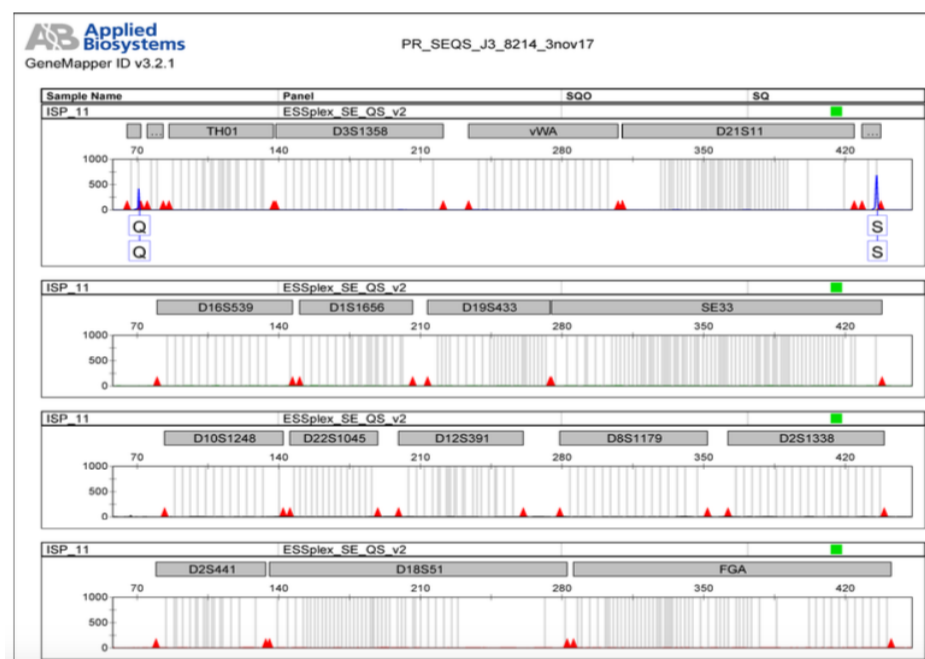
Slika 25 prikazuje elektroferogram negativne kontrole reakcije PCR, ni pomnoženih lokusov STR.



Slika 25: Elektroferogram, negativna kontrola reakcije PCR.

NEGATIVNA KONTROLA EKSTRAKCIJE

Slika 26 prikazuje elektroferogram negativne kontrole ekstrakcije; ni pomnoženih lokusov STR.



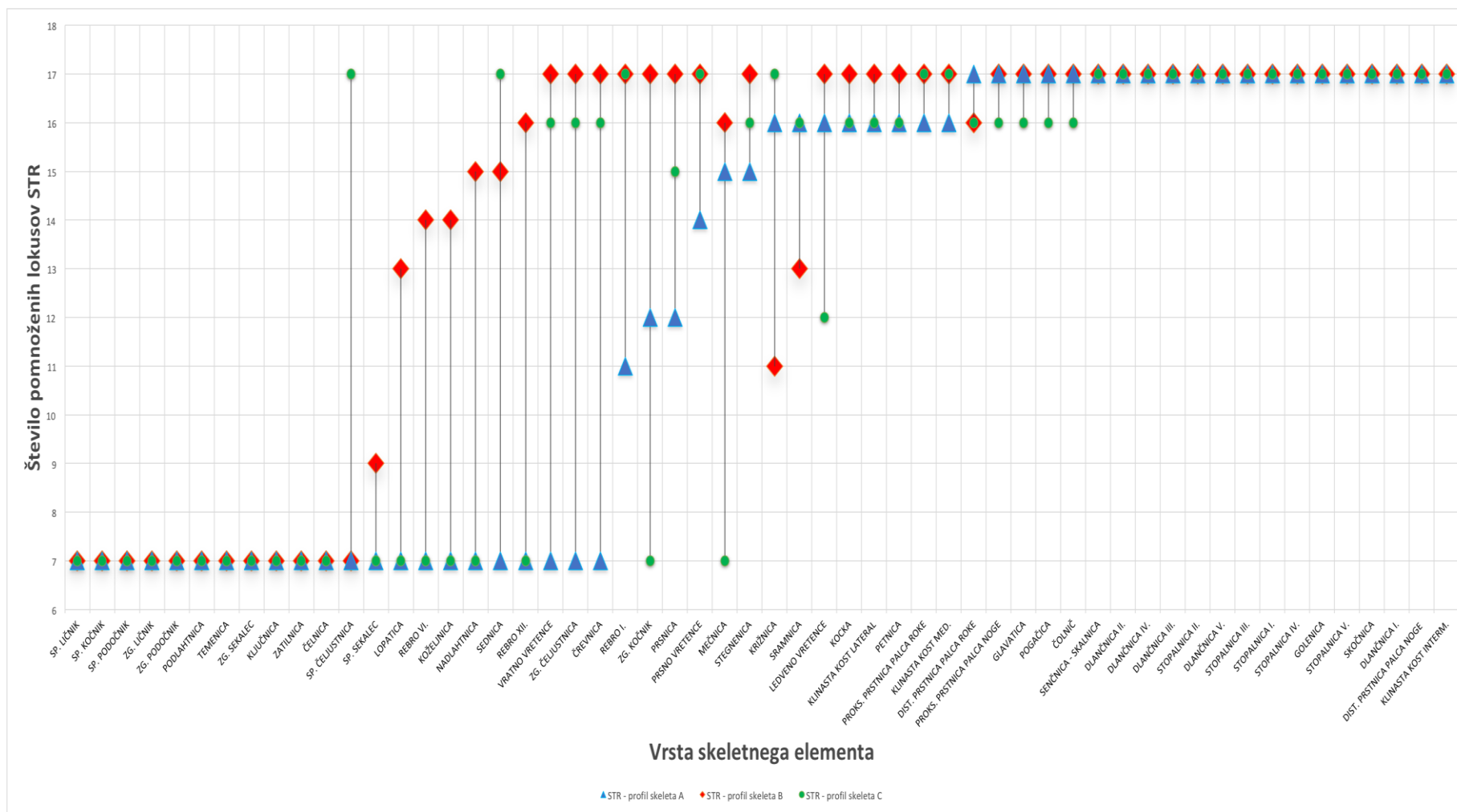
Slika 26: Elektroferogram, negativna kontrola ekstrakcije serije 11.

V *Preglednici XI* je prikazano, pri kolikih izmed treh skeletov smo iz posameznega skeletnega elementa pridobili celotni profil ter povprečno število uspešno pomnoženih lokusov na skeletni element. V *Preglednicah VIII, IX, X* so prikazana števila uspešno pomnoženih lokusov za vsakega izmed analiziranih vzorcev. Na *Sliki 27* je prikazano število uspešno pomnoženih lokusov za skeletne elemente vseh treh skeletov. V *Preglednici XII* so zbrani genetski profili skeletov A, B, in C.

Preglednica XII: Zbrani genetski profili skeletov A, B in C iz grobišča Huda jama.

	SKELET A	SKELET B	SKELET C
Amelogenin	X/Y	X/Y	X/Y
TH01	6/6	9/9.3	6/9
D3S1358	15/17	15/16	15/16
Vwa	17/18	14/16	15/16
D21S11	28/30	28/30	29/30
D16S539	12/13	13/14	11/12
D1S1656	12/18.3	15/17	11/17.3
D19S433	12/14	14/15	12/12
SE33	15/28.2	27.2/29.2	16.1/27.2
D10S1248	13/13	15/17	14/16
D22S0145	15/16	11/15	11/15
D12S391	22/25	18/19	20/22
D8S1179	13/14	9/16	14/15
D2S1338	20/24	17/25	16/26
D2S441	10/14	14/14	10/10
D18S51	13/18	13/17	15/16
FGA	21/22	19/20	21/22

Slika 27 prikazuje uspešno pomnožene lokuse STR, ki smo jih pomnoževali s kompletom Investigator® ESSplex SE QS (Qiagen), glede na vrsto skeletnega elementa. Na osi x so prikazana imena skeletnih elementov, na osi y pa število uspešno pomnoženih lokusov STR; 7 predstavlja vse vrednosti, ki so manjše od 8.



Slika 27: Prikaz števila uspešno pomnoženih lokusov STR po skeletih glede na vrsto skeletnega elementa.

Pri profilih, ki smo jih označili kot celotni profili, smo uspešno pomnožili alele na vseh preiskovanih lokusih. Če nismo uspeli pomnožiti alelov za vse preiskovane lokuse (17/17), a smo vseeno uspešno pomnožili 8 ali več alelov, smo tak profil označili kot delni. Vse profile, kjer smo uspešno pomnožili zgolj 7 ali manj preiskovanih lokusov, smo označili kot neprimerne za interpretacijo.

Izmed **skupno 168 analiziranih elementov** skeletov A, B in C smo **celotne profile** pridobili iz **75 vzorcev**, **delne profile iz 40 vzorcev**, iz **53 vzorcev** pa **profila nismo uspeli pridobiti**.

Izmed **56 različnih vrst skeletnih elementov** smo za **15 elementov** pridobili celoten profil za vse tri preiskovane skelete. Za **8/56 skeletnih elementov** smo pridobili celoten profil pri **2/3 preiskovanih skeletov**. Za **14/56 elementov** smo pridobili celoten profil za **1/3 preiskovanih skeletov**. Za **19/56 skeletnih elementov** nismo uspeli pridobiti celotnega profila pri nobenem izmed treh skeletov.

Uspešnost pridobitve genetskega profila v povezavi s količino DNA v ng/g kosti oziroma zoba

Stopnja degradacije DNA za napoved uspešnosti genotipizacije ni bila najprimernejši parameter, nasprotno pa smo ugotovili, da je za napoved uspešnosti tipizacije mnogo bolj poveden parameter povprečne količine DNA v ng na g kostnega oziroma zobnega prahu preiskovanih skeletnih elementov.

Celoten profil smo pri vseh treh skeletih pridobili za 15/56 elementov; **14 izmed njih (intermedialna klinasta kost, distalna prstnica palca noge, dlančnice (I, II, III, IV, V), senčnica - skalnica, skočnica in stopalnice (I, II, III, IV, V))** je bilo hkrati tudi med prvimi 20 elementi glede na povprečno količino DNA v ng na g kosti oziroma zob vseh treh skeletov. Izjema je bila **golenica**, ki je izmed vseh skeletnih elementov, pri katerih smo uspešno pridobili celotne profile pri vseh treh skeletih, imela najnižjo povprečno količino DNA v ng na g kosti (2,4 ng DNA/g kosti) in se je tako glede na kriterij količine DNA uvrstila na 25. mesto. **Vseh 15 elementov lahko označimo kot najprimernejše za uporabo v namen identifikacije** (Slika 11, Slika 27).

Med najprimernejše lahko uvrstimo še elemente, pri katerih smo uspešno pridobili celoten profil pri dveh skeletih, pri tretjem skeletu pa smo pridobili delni profil s 16/17 pomnoženimi aleli preiskovanih lokusov, hkrati pa so vsi ti elementi glede na povprečno količino DNA vseh treh skeletov med prvimi dvajsetimi elementi. Ti elementi so: glavatica, proksimalna prstnica palca roke, medialna klinasta kost, in pogačica. (Slika 11, Slika 27) Dodali bi lahko še proksimalno prstnico palca noge, saj je dala celoten profil pri dveh skeletih, pri tretjem skeletu pa smo pridobili delni profil z izpadom enega lokusa, saj je pri genetski identifikaciji kriterij uspešne pridobitve genetskega profila najpomembnejši. Pri štirih skeletnih elementih – distalna prstnica palca roke, petnica, lateralna klinasta kost in kocka – smo celoten profil pridobili pri enem izmed treh skeletov, pri ostalih dveh skeletih pa smo pridobili delna (skoraj celotna) profila s 16/17 uspešno pomnoženimi lokusi STR.

8/14 najuspešnejših elementov (senčnica – skalnica, dlančnici II, III, stopalnica I., III, V., distalna prstnica palca noge, intermedialna klinasta kost), glede na povprečje rezultatov kvantifikacij skeletov A, B C in njihove genotipizacije, je bilo med prvimi dvajsetimi tudi posamezno pri vsakem izmed treh skeletov.

Skeletni elementi, za katere smo pri vseh treh skeletih (A, B in C) pridobili celoten profil, a se glede na količino DNA niso pri vsakem izmed treh skeletov ločeno uvrstili med prvih 20:

- *Golenica* se je po tem kriteriju (količina DNA v ng/g kosti) med prvih 20 uvrstila le pri skeletu C (10. mesto), kljub temu pa smo tudi pri skeletih A (26. mesto) in B (28. mesto) iz nje pridobili celoten profil.
- *Dlančnica I*, za katero smo pri vseh treh skeletih pridobili celoten profil, se je med prvih 20 (količina DNA ng/g kosti)) uvrstila pri skeletu A (11. mesto) in pri skeletu B (6. mesto), pri skeletu C pa na 25. mesto.
- *Dlančnica IV* se je med prvih 20 (količina DNA v ng/g kosti) uvrstila pri skeletih A (9. mesto) in C (1. mesto), pri skeletu B pa na 27. mesto; pri vseh treh skeletih smo iz nje pridobili celoten profil.

- *Dlančnica V* se je med prvih 20 (količina DNA v ng/g kosti) uvrstila pri skeletih A (7. mesto) in C (2. mesto), pri skeletu B pa je bila na 37. mestu; pri vseh treh skeletih smo iz nje pridobili celoten profil.
- *Stopalnica II*, iz katere smo pri vseh treh skeletih pridobili celoten profil, se je med prvih 20 (količina DNA v ng/g kosti) uvrstila pri skeletu A (3. mesto) in skeletu C (6. mesto), pri skeletu B pa se je uvrstila na 29. mesto.
- *Stopalnica IV*, iz katere smo pri vseh treh skeletih pridobili celoten profil, se je med prvih 20 (količina DNA v ng/g kosti) uvrstila pri skeletu A (2. mesto) in skeletu C (5. mesto), pri skeletu B pa se je uvrstila na 36. mesto.
- *Skočnica* se je med prvih 20 (količina DNA v ng/g kosti) uvrstila pri skeletu A (17. mesto), in pri skeletu B (5. mesto) vendar smo tudi pri skeletu C (26. mesto) iz nje pridobili celoten profil.

Elementi, za katere smo kljub nižjim količinam DNA uspešno pridobili celotne profile, so pri skeletu A golenica, pri skeletu B golenica, dlančnica IV in V, stopalnica II in IV, pri skeletu C pa dlančnica I in skočnica. En pripada skeletu A (golenica), večina jih pripada skeletu B (golenica, dlančnica IV, dlančnica V, stopalnica II in stopalnica IV), dva pa skeletu C (dlančnica I, skočnica).

Primerjava s skeletnimi elementi, ki sta jih kot najboljše označila raziskovalca Mundorff in Davoren

Prvih 20 skeletnih elementov, v katerih sta Mundorff in Davoren določila največjo količino DNA (v ng/g kosti ali zoba) (našteti po padajoči količini DNA) so: distalna prstnica palca roke, sledili so intermedialna klinasta kost, zgornji kočnik, zgornji sekalec, skočnica, zgornji podočnik, lateralna klinasta kost, kocka, 1. rebro, glavatica, spodnji sekalec, čolnič, spodnji podočnik, zgornji kočnik, petnica, dlančnica IV, spodnji kočnik, stopalnica II, stopalnica V in medialna klinasta kost (16).

Prvih 20 skeletnih elementov, v katerih smo določili največjo količino DNA (v ng/g kosti) mi, so (padajoče po količini): dlančnica III, stopalnica III, stopalnica IV, stopalnica II, dlančnica IV, stopalnica I, dlančnica V, proksimalna prstnica palca roke, dlančnica II, senčnica – skalnica, glavatica, intermedialna klinasta kost, medialna klinasta kost, distalna

prstnica palca noge, pogačica, dlančnica I, skočnica, stopalnica V, distalna prstnica palca roke in petnica.

Skupne točke smo opazili pri kosteh rok in nog, medtem ko so zobje, ki so v študiji raziskovalcev Mundorff in Davorena (16) med elementi, iz katerih so povprečno pridobili največ DNA, v našem primeru prepričljivo med najslabšimi po količini DNA (v ng/g zobnega prahu).

Kot najprimernejše za nadaljnjo analizo sta Mundorff in Davoren izbrala 10 sledečih elementov: vratno vretence, VI. rebro, golenico, stegnenico, pogačico, dlančnico IV, distalno prstnico palca roke, stopalnico IV, skočnico in medialno klinasto kost stopala (16). V naši analizi smo kot najprimernejše glede na povprečno količino DNA in število uspešno pomnoženih lokusov določili vse dlančnice, vse stopalnice, intermedialno klinasto kost stopala, distalno prstnico palca noge, senčnico – skalnico, skočnico, golenico, glavatico, proksimalno prstnico palca roke, proksimalno prstnico palca noge, medialno klinasto kost stopala, pogačico in čolnič (skupno 21 skeletnih elementov). Če dodamo še skeletne elemente, ki so dali celotne profile pri enem skeletu in delne profile z izpadom enega lokusa STR pri dveh skeletih, je potrebno naštetim kostem dodati še distalno prstnico palca roke, petnico, lateralno klinasto kost in kocko (skupaj 25 skeletnih elementov).

Podobno kot Mundorff in Davoren smo tudi mi na podlagi rezultatov kot najprimernejše določili večinoma majhne spongiozne kosti rok in nog, ki so se glede na rezultate kvantifikacije in tipizacije vselej uvrščale med najboljše.

Primerjava skeletnih elementov z rezultati in priporočili nekaterih drugih študij

Zaključki in priporočila, ki smo jih osnovali na podlagi dobljenih rezultatov, se od nekaterih v uvodu omenjenih študij in priporočil (83, 86, 87, 88, 89) precej razlikujejo. Slednje kot najprimernejše družno označujejo dolge, kompaktne kosti rok in nog, nasprotno pa naši rezultati kažejo, da so najprimernejše majhne, spongiozne kosti rok in nog – do podobnih zaključkov prihaja tudi Mundorff s sodelavci (90), ki opisuje stopalnice in prstnice nog kot enako ali celo bolj primerne kot stegnenice in golenice. S slednjim je skupne točke je delno moč najti v raziskavi Prinza in sodelavcev (83) ter priporočilih Interpola (87), kjer spongiozno kostnino označujejo kot dober vir DNA, a je v svoja priporočila ne uvrščajo zaradi dvoma v zmožnost njenega ohranjanja skozi čas.

Nadalje lahko zobe v skladu z dobljenimi rezultati označimo kot najmanj primerne za identifikacijo. Slednje se močno razlikuje od rezultatov sorodnih raziskav nekaterih drugih prikritih slovenskih množičnih vojnih grobišč, ki jih je izvedla Zupanič Pajnič s sodelavci (93, 94), kjer so rezultati analiz zob bili v splošnem neprimerljivo boljši. Tovrsten kontrast je presenetljiv, saj ga glede na časovni in okoljski aspekt morda ne bi pričakovali; starost skeletnih elementov in okolje sta namreč precej podobna. Naši rezultati prav tako niso skladni s priporočili Prinza in sodelavcev (83), trenutnimi priporočili Interpola (87), združenja National Association of Medical Examiners (88) in inštituta National Institute of Justice (89) – vsi izmed naštetih namreč kot drugo izbiro, takoj za dolgimi, kompaktnimi kostmi, priporočajo uporabo zob.

Kosti glave so v nekaterih omenjenih raziskavah (86, 90) bile označene kot najmanj primerne, vendar pa nekatere najsodobnejše raziskave (25, 26, 29), vključno z našo, temu nasprotujejo. Poleg majhnih, spongioznih kosti rok in nog smo namreč med najprimernejše uvrstili del senčnice – skalnico. Sovpadajoči z našimi so tudi rezultati in dognanja, do katerih prihajajo Phili in sodelavci (26), ki skalnico označujejo kot bolj primerno od kompaktnih kosti in zob, ter Gamba in sodelavci (29), ki skalnici dajejo prednost pred zobmi, medtem ko Hansen v svoji raziskavi (25) trdi, da dobro ohranjen zobni cement daje enake ali boljše rezultate kot skalnica, v slabših ohranitvenih pogojih pa skalnica zaradi večje odpornosti in boljše zaščite daje boljše rezultate. S slednjim najdemo vzporednico v naši raziskavi – množično grobišče Huda jama lahko označimo kot okolje s slabšimi ohranitvenimi pogoji, v skladu s tem pa so rezultati analiz skalnic v primerjavi z zobmi bili mnogo boljši.

Določitev spodnje meje količine DNA, ki je na osnovi kvantifikacije avtosomskega fragmenta še primerna za tipizacijo lokusov STR

Za določitev spodnje meje količine DNA, ki je še primerna za tipizacijo STR - lokusov, smo, podobno kot so to storili Poetsch in sodelavci (95), vseh 168 skeletnih elementov razdelili v dve skupini: na tiste, pri katerih smo uspešno pridobili delni ali celotni profil DNA (primeren za interpretacijo), in tiste, pri katerih dobljeni profil STR ni bil primeren za interpretacijo (manj kot 8 pomnoženih lokusov). Ob tem smo upoštevali dva kriterija; vsaj 85 % vzorcev nad določeno spodnjo mejo mora imeti profil, ki je primeren za interpretacijo (in največ 15 % vzorcev nad določeno spodnjo mejo ima lahko profil, ki ni primeren za interpretacijo) in vsaj 95 % vzorcev pod določeno spodnjo mejo mora imeti

profil, ki ni primeren za interpretacijo (in največ 5 % vzorcev pod določeno spodnjo mejo lahko ima profil, ki je primeren za interpretacijo). Spodnjo mejo količine DNA, ki je na osnovi kvantifikacije avtosomskega fragmenta še primerna za tipizacijo lokusov STR, smo določili pri **0,00095 ng / µl**. Nad določeno spodnjo mejo se nahaja 122/168 skeletnih elementov; izmed 122 je 115 (94,3 %) takih, ki imajo profil primeren za interpretacijo, 7 (5,7 %) pa jih ima profil, ki ni primeren za interpretacijo. Pod spodnjo mejo količine DNA, ki smo jo določili, se nahaja 46 skeletnih elementov – vseh 46 (100 %) ima profil, ki ni primeren za interpretacijo.

REZULTATI GENOTIPIZACIJE LOKUSOV STR OSEB V ELIMINACIJSKI ZBIRKI

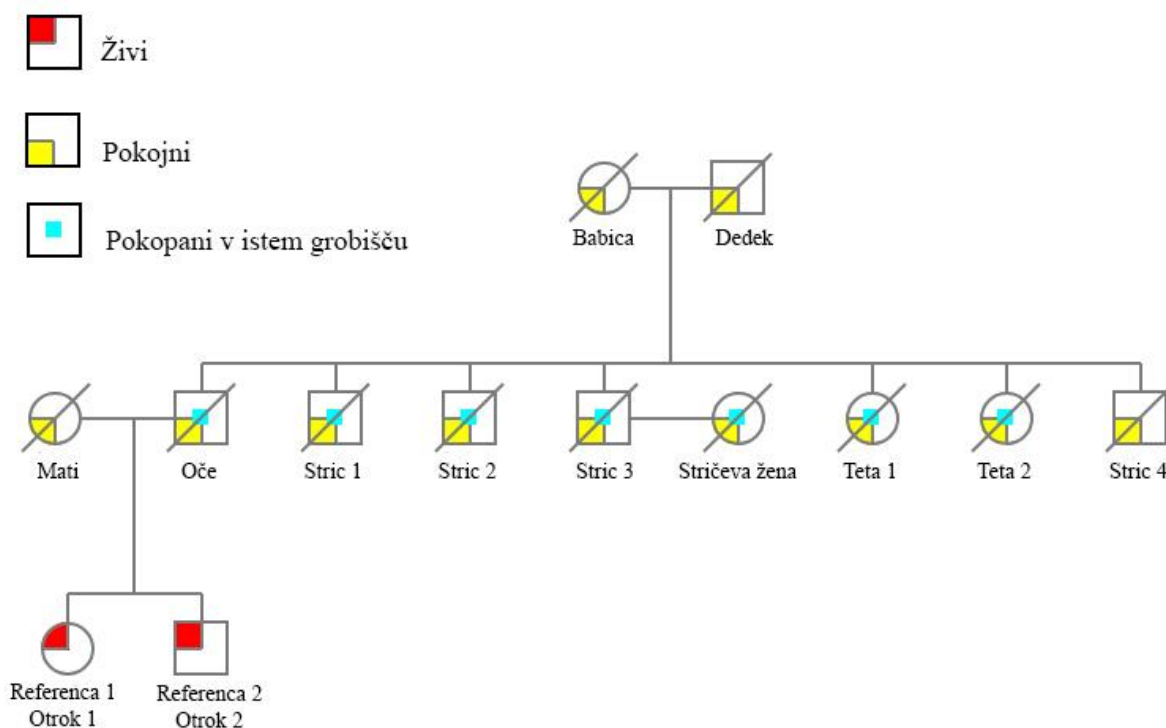
V **Preglednici XIII** so prikazani profili oseb, ki smo jih vključili v eliminacijsko zbirko. Profile v eliminacijski zbirki smo primerjali s profili skeletov A, B in C – med njimi ni bilo ujemanja, kar pomeni, da ni prišlo do kontaminacije skeletnih elementov z DNA oseb, ki smo prišle v stik s kostmi in zobmi skeletov A, B in C. Zaradi varovanja osebnih podatkov so imena šifrirana.

Preglednica XIII: Eliminacijska zbirka genetskih profilov za vzorce iz grobišča Huda jama.

	OEB1	OEB2	OEB3	OEB4	OEB5	OEB6	OEB7	OEB8	OEB9
Amelogenin	X/Y	X/X	X/X	X/X	X/Y	X/Y	X/Y	X/X	X/Y
TH01	6/8	7/9.3	8/9	6/9	5/6	6/6	8/8	8/9.3	6/9.3
D3S1358	15/18	14/17	16/16	14/18	15/16	14/15	16/16	18/18	14/18
vWA	17/19	14/16	18/18	17/18	17/17	17/17	14/17	14/17	16/17
D21S11	30/30.2	29/31	28/30	30/30.2	31/32.2	28/29	30/31	30/31.2	30/30
D16S539	12/13	9/9	9/12	11/12	11/13	12/12	11/12	12/12	12/12
D1S1656	15/17	12/17.3	11/11	11/14	15/15.3		16/17.3		
D19S433	15/15	13/15.2	13/14	15/16	12/15	14/16	14/15	13/13	14/17.2
D10S1248	12/13	14/16	14/14	15/16	13/14		14/14		
D22S0145	15/15	16/16	16/16	15/15	11/17		17/18		
D12S391	23/23	22/22	15/21	17/18	18/22		18/21		
D8S1179	14/14	10/14	13/16	13/15	14/14	12/14	11/13	12/13	10/11
D2S1338	17/24	17/20	17/25	24/26	25/25	17/17	24/25	20/24	17/20
D2S441	10/10	14/14	10/11	10/11.3	11/14		14/15		
D18S51	16/19	10/17	17/19	12/16	13/15	12/18	16/16	14/17	17/17
FGA	20/24	20/20	19/20	22/24	21/23	20/21	22/24	22/24	20/21

IDENTIFIKACIJA ŽRTEV IZ GROBIŠČA BABNA GORA

Identifikacijo žrtev iz grobišča Babna Gora smo opravili s pomočjo primerjave z dvema referenčnima osebama; primerjali smo avtosomska STR področja in haplotipe kromosoma Y. Domnevne sorodstvene povezave med referenčnima osebama in žrtvami so prikazane v obliki družinskega drevesa na **Sliki 28**; žrtve, ki smo jih želeli identificirati, so označene s »Pokopani v istem grobišču«. Referenčni osebi sta brat in sestra, domnevne sorodstvene povezave žrtev z njima pa so: oče, trije strici po očetovi strani, dve teti po očetovi strani in žena enega izmed stricev – za slednjo nismo imeli referenčnega vzorca, zato identifikacija ni možna.



Slika 28: Družinsko drevo žrtev iz grobišča Babna Gora s prikazanimi pokojnimi in še živečimi sorodniki ter sorodstvenimi vezmi.

REZULTATI KVANTIFIKACIJE

V **Preglednici XIV** so prikazane povprečne vrednosti duplicirane kvantifikacije za posamezno kost oziroma zob. Pri dveh vzorcih iz ženskega groba (skelet 1 – golenica; skelet 3 – golenica) nismo zaznali DNA. Degradacijski fragment smo pri skeletnih elementih iz ženskega groba uspešno določili le pri spodnjem levem kočniku skeleta 2 in

pri desni golenici skeleta 2. Pri kosteh iz moškega groba degradacijskega fragmenta nismo uspeli določiti pri stegnenici 3. Odsotnost degradacijskega fragmenta nakazuje na močno fragmentirano DNA. Področje na kromosomu Y smo uspešno določili za vse elemente iz moškega groba. Notranja IPC kontrola je pokazala, da so pri stegnenici skeleta 1 (ženski grob) bili prisotni inhibitorji (IPC Shift = 0,59; mejna vrednost je 0,3). Pri ostalih vzorcih ni bilo opaziti inhibicije. Razmerje koncentracij avtosomskega in degradacijskega fragmenta v vseh primerih kaže na fragmentirano DNA (mejna vrednost je 2).

Preglednica XIV: Rezultati kvantifikacije za DNA izolirano iz kosti, najdene v moškem in ženskem grobišču Babna Gora.

Vzorec	PQ Auto AVERAGE	PQ Deg AVERAG E	PQ Y AVERA GE	PQ IPC Shift AVERAGE	PQ [Auto]/[Deg] razmerje AVERAGE
ŽENSKI GROB-SKELET 1- STEGNENICA	0,0003	/	/	0,59	nedoločeno
ŽENSKI GROB-SKELET 1- GOLENICA	/	/	/	-0,49	/
ŽENSKI GROB-SKELET 2- SPODNJI LEVI KOČNIK	0,0054	0,0012	/	-0,44	4,61
ŽENSKI GROB-SKELET 2- D STEGNENICA	0,0029	/	/	-0,07	nedoločeno
ŽENSKI GROB-SKELET 2- D GOLENICA	0,002	0,0006	/	-0,38	3,22
ŽENSKI GROB-SKELET 3- GOLENICA	/	/	/	-0,31	/
ŽENSKI GROB-ISP	/	/	/	-0,33	/
MOŠKI GROB- STEGNENICA 1	0,027	0,006	0,0149	-0,53	4,47
MOŠKI GROB- STEGNENICA 2	0,0046	0,0018	0,0031	-0,44	2,57
MOŠKI GROB- STEGNENICA 3	0,0003	/	0,0002	-0,42	nedoločeno
MOŠKI GROB- STEGNENICA 4	0,0015	0,0002	0,0005	-0,51	7,38
MOŠKI GROB- STEGNENICA 5	0,0048	0,0009	0,0017	-0,51	5,12
MOŠKI GROB- STEGNENICA 6	0,0193	0,0059	0,0107	-0,42	3,29
MOŠKI GROB-ISP	/	/	/	-0,24	/

REZULTATI GENOTIPIZACIJE AVTOSOMSKIH PODROČIJ STR

Pri stegnenici in golenici skeleta 1 in golenici skeleta 3 ženskega groba in stegnenici 3 moškega groba nismo uspeli pridobiti genetskega profila (Preglednica XV). Pri istih

vzorcih ni bilo možno zaznati degradacijskega fragmenta, koncentracija avtosomskega fragmenta pa je prav tako bila nizka ali nezaznavna, zato lahko sklepamo, da je neuspešna genotipizacija posledica preveč razgrajene DNA, prisotnosti inhibitorjev in prenizke količine DNA. Izjema je bila stegnenica skeleta 2 ženskega groba, kjer smo pridobili celoten profi, kljub temu da degradacijskega fragmenta nismo zaznali, je pa bila koncentracija avtosomskega fragmenta skoraj 10-krat višja (*Preglednica XIV*) od prej omenjenih kosti, kjer degradacijskega fragmenta prav tako nismo zaznali. Pri ostalih kosteh in zobeh smo pridobili kompletne profile, le pri dveh kosteh smo pridobili delne profile (golenica skeleta 2 ženski grob in stegnenica 4 moški grob). Glej **Preglednico XV**, ki prikazuje število uspešno pomnoženih lokusov pri analiziranih vzorcih glede na amplifikacijski komplet.

Preglednica XV: Prikaz števila uspešno pomnoženih lokusov pri analiziranih vzorcih glede na amplifikacijski komplet.

Vrsta kosti	STR ESSPLEX PLUS	STR ESI 17	STR NGM	PPY23
ŽENSKI GROB-SKELET 1- STEGNENICA		< 8 lokusov	< 8 lokusov	
ŽENSKI GROB-SKELET 1- GOLENICA		< 8 lokusov	< 8 lokusov	
ŽENSKI GROB-SKELET 2- SPODNJI LEVI KOČNIK		17/17 (1xHO)	16/16 (3xHO)	
ŽENSKI GROB-SKELET 2-D STEGNENICA		17/17	16/16 (1xHO)	
ŽENSKI GROB-SKELET 2-D GOLENICA		15/17 (1xHO)	14/16 (5xHO)	
ŽENSKI GROB-SKELET 3- GOLENICA		< 8 lokusov	< 8 lokusov	
ŽENSKI GROB-ISP		0/17	0/16	
MOŠKI GROB-STEGNENICA 1	16/16		16/16	23/23
MOŠKI GROB-STEGNENICA 2	16/16		16/16	23/23
MOŠKI GROB-STEGNENICA 3	< 8 lokusov		< 8 lokusov	< 8 lokusov
MOŠKI GROB-STEGNENICA 4	14/16 (6xHO)		13/16 (7xHO)	22/23
MOŠKI GROB-STEGNENICA 5	14/16		16/16(4xHO)	23/23
MOŠKI GROB-STEGNENICA 6	16/16		16/16	23/23
MOŠKI GROB-ISP	0/16		0/16	0/23

V **Preglednici XVI** so prikazani genotipi za preiskovane lokuse STR pri posameznih vzorcih, konsenzusni profili in profila referenčnih oseb. Profilov skeleta 1 in 3 ženskega groba ter golenice 3 moškega groba nismo uspeli pridobiti.

Preglednica XVI: Rezultati tipizacije avtosomskih STR področij žrtev in dveh še živečih sorodnikov.

	Amelogenin	TH01	D3S1358	vWA	D21S11	D16S539	D1S165 6	D19S4 33	D8S1 179	D2S13 38	D10S1 248	D22S0 145	D12S3 91	FGA	D2S44 1	D18S 51	SE33
ŽENSKI GROB-SKELET 2-D STEGNETICA-ESI 17	X/X	7/9	14/18	14/16	30/32	11/12	11/15	14/14	16/16	21/23	13/14	16/16	18/23	19/25	11/15	11/16	16/20
ŽENSKI GROB-SKELET 2-D STEGNETICA-NGM	X/X	7/9	14/18	14/16	30/32	11/12	11/15	14/14	16/16	21/21	13/14	16/16	18/23	19/25	11/15	11/16	
ŽENSKI GROB-SKELET 2-D GOLENICA-ESI 17	X/X	7/9	14/18	14/16	30/32	11/12	11/15	14/14	16/16			16/16	23/23	19/25	11/15	11/16	16/20
ŽENSKI GROB-SKELET 2-D GOLENICA-NGM	X/X		14/18	14/16	32/32	11/11	11/15	14/14	16/16	21/21	13/13	16/16	23/23	19/25	11/15		
ŽENSKI GROB-SKELET 2-SPODNJI LEVI KOČNIK 2-ESI 17	X/X	7/9	14/18	14/16	30/32	11/12	11/15	14/14	16/16	21/23	13/14	16/16	18/23	19/25	11/15	11/16	20/20
ŽENSKI GROB-SKELET 2-SPODNJI LEVI KOČNIK 2-NGM	X/X	7/9	14/18	14/16	30/32	11/12	11/15	14/14	16/16	23/23	13/14	16/16	18/23	19/19	11/15	11/11	
ŽENSKI GROB-KONSENZUSNI PROFIL - SKELET 2	X/X	7/9	14/18	14/16	30/32	11/12	11/15	14/14	16/16	21/23	13/14	16/16	18/23	19/25	11/15	11/16	16/20
MOŠKI GROB-STEGNETICA 2-ESSplex Plus	X/Y	7/9	14/18	15/16	28/29	11/12	13/14	13/14	13/16	23/23	14/16	15/16	18/23	19/23	10/11	12/16	
MOŠKI GROB-STEGNETICA 2-NGM	X/Y	7/9	14/18	15/16	28/29	11/12	13/14	13/14	13/16	23/23	14/16	15/16	18/23	19/23	10/11	12/16	
MOŠKI GROB-STEGNETICA 2-KONSENZUSNI PROFIL	X/Y	7/9	14/18	15/16	28/29	11/12	13/14	13/14	13/16	23/23	14/16	15/16	18/23	19/23	10/11	12/16	
MOŠKI GROB-STEGNETICA 1-ESSplex Plus	X/Y	7/9	14/18	14/14	29/30	11/12	13/14	13/14	16/16	18/21	14/16	15/16	15/23	22/23	10/11	12/19	
MOŠKI GROB-STEGNETICA 1-NGM	X/Y	7/9	14/18	14/14	29/30	11/12	13/14	13/14	16/16	18/21	14/16	15/16	15/23	22/23	10/11	12/19	
MOŠKI GROB-STEGNETICA 6-ESSplex Plus	X/Y	7/9	14/18	14/14	29/30	11/12	13/14	13/14	16/16	18/21	14/16	15/16	15/23	22/23	10/11	12/19	
MOŠKI GROB-STEGNETICA 6-NGM	X/Y	7/9	14/18	14/14	29/30	11/12	13/14	13/14	16/16	18/21	14/16	15/16	15/23	22/23	10/11	12/19	

MOŠKI GROB-KONSENZUSNI PROFIL - STEGNETICA 1 IN 6	X/Y	7/9	14/18	14/14	29/30	11/12	13/14	13/14	16/16	18/21	14/16	15/16	15/23	22/23	10/11	12/19	
MOŠKI GROB-STEGNETICA 4-ESSPIex Plus	X/Y	6/9	14/15	16/16	28/29	11/12	11/11	13/13			13/14	15/15	18/18	19/19	11/15	11/19	
MOŠKI GROB-STEGNETICA 4-NGM	X/Y		15/15	16/16	28/29	11/12	11/11	13/13			13/14	15/15	18/18	19/19	11/15	11/19	
MOŠKI GROB-STEGNETICA 5-ESSPIex Plus	X/Y	6/9	14/15	14/16		11/12	11/15	13/14	13/16	23/23	13/14	15/16	18/23		11/15	11/19	
MOŠKI GROB-STEGNETICA 5-NGM	X/Y	6/9	14/15	14/16	28/28	11/12	11/11	13/14	13/16	23/23	13/14	15/16	18/18	19/25	11/15	11/11	
MOŠKI GROB-KONSENZUSNI PROFIL - STEGNETICA 4 IN 5	X/Y	6/9	14/15	14/16	28/29	11/12	11/15	13/14	13/16	23/23	13/14	15/16	18/23	19/25	11/15	11/19	
REFERENCA 1 (Otrok 1)	X/Y	8/9	14/14	14/16	29/32	12/12	13/15	13/14	13/15	20/23	14/14	16/16	18/19	23/23	10/14	13/16	20/21.2
REFERENCA 2 (Otrok 2)	X/X	6/7	14/14	14/16	29/32.2	11/12	14/15	14/14	15/16	23/25	14/14	16/16	18/19	19/23	11/14	12/13	21.2/22.2

REZULTATI TIPIZACIJE HAPLOTIPOV KROMOSOMA Y

V **Preglednici XVII** so prikazani haplotipi kromosoma Y petih stegenic iz moškega groba Babna Gora in haplotip kromosoma Y referenčne osebe – lokuse smo tipizirali s kompletom PowerPlex Y23 (Promega). Za dve žrtvi smo ustvarili konsenzusni profil. Na lokusu DYS391 so vse žrtve imele alel 10, medtem ko ima referenčna oseba alel 9 (označeno z rdečo barvo). Na lokusu DYS391 med žrtvami in referenčno osebo torej ni ujemanja, pri čemer gre za enostopenjsko STR mutacijo – število ponovitev osnovnega motiva se je na mutiranem lokusu spremenilo za 1 (84).

Preglednica XVII: Rezultati tipizacije haplotipov kromosoma Y moških žrtev in živečega moškega sorodnika.

Vzorec	DY S5 76	DY S3 89I	DY S4 48	DY S38 9II	D YS 19	DY S3 91	DY S4 81	DY S5 49	DY S5 33	DY S4 38	DY S4 37	DY S5 70	DY S6 35	DY S3 90	DY S4 39	DY S3 92	DY S6 43	DY S3 93	DY S4 58	DYS 385 a,b	DY S4 56	YG AT AH 4
Moški grob - stegnenica 1	16	12	21	28	14	10	25	13	11	10	16	21	21	22	11	11	12	14	17	12, 13	13	11
Moški grob - stegnenica 6	16	12	21	28	14	10	25	13	11	10	16	21	21	22	11	11	12	14	17	12, 13	13	11
Stegnenici 1 in 6 - konsenzusni profil	16	12	21	28	14	10	25	13	11	10	16	21	21	22	11	11	12	14	17	12, 13	13	11
Moški grob - stegnenica 2	16	12	21	28	14	10	25	13	11	10	16	21	21	22	11	11	12	14	17	12, 13	13	11
Moški grob - stegnenica 4	16	12	21	28		10	25	13	11	10	16	21	21	22	11	11	12	14	17	12, 13	13	11
Moški grob - stegnenica 5	16	12	21	28	14	10	25	13	11	10	16	21	21	22	11	11	12	14	17	12, 13	13	11
Stegnenici 4 in 6 - konsenzusni profil	16	12	21	28	14	10	25	13	11	10	16	21	21	22	11	11	12	14	17	12, 13	13	11
Referenca 1 (Otrok 1)	16	12	21	28	14	9	25	13	11	10	16	21	21	22	11	11	12	14	17	12, 13	13	11

GENOTIPIZACIJA DNA OSEB V ELIMINACIJSKI ZBIRKI

V **Preglednici XVIII** so prikazani profili oseb, ki smo jih vključili v eliminacijsko zbirko. Profile v eliminacijski zbirki smo primerjali s profili, pridobljenimi iz skeletnih elementov iz grobišča Babna Gora - med njimi ni bilo ujemanja. Zaradi varovanja osebnih podatkov so imena šifrirana.

Preglednica XVIII: Profili oseb v eliminacijski zbirki za vzorce grobišča Babna Gora.

	OSEZ1	OSEZ 2	OSEZ 3	OSEZ 4	OSEZ5	OSEZ6	OSEZ 7	OSEZ 8	OSEZ 9	OSEZ 10
Amelogenin	X/X	X/X	X/X	X/X	X/Y	X/X	X/Y	X/Y	X/X	X/Y
TH01	6/9	7/9.3	8/9	8/9.3	6/8	8/9	6/9.3	6/9.3	9/9.3	7/9.3
D3S1358	14/18	14/17	16/16	18/18	15/18	15/17	15/16	17/17	15/16	14/18
vWA	17/18	14/16	18/18	14/17	17/19	16/16	16/18	16/17	14/18	17/17
D21S11	30/30.2	29/31	28/30	30/31. 2	30/32.2	30.2/30 .2	28/31. 2	29/30	29/30	29/32. 2
D16S539	11/12	9/9	9/12	12/12	12/13	8/12	12/12	11/12	13/13	10/12
D1S1656	11/14	12/17. 3	11/11		15/17		11/18. 3	13/15. 3	11/13	11/17. 3
D19S433	15/16	13/15. 2	13/14	13/13	15/15	14/14	12/16. 2	13/14. 2	13/16. 2	13/14
D8S1179	13/15	10/14	13/16	12/13	14/14	14/14	13/14	10/12	10/13	13/16
D2S1338	24/26	17/20	17/25	20/24	17/24	17/25	20/23	17/24	16/24	17/20
D10S1248	15/16	14/16	14/14		12/13		13/13	13/16	14/15	13/16
D22S0145	15/15	16/16	16/16		15/15		15/15	16/17	16/16	15/16
D12S391	17/18	22/22	15/21		23/23		18/22	18/18. 3	17/23	18/22
FGA	22/24	20/20	19/20	22/24	20/24	21/24	22/24	20/24	20/20	20/26
D2S441	10/11.3	14/14	10/11		10/10		10/10	11/14	14/14	10/11
D18S51	12/16	10/17	17/19	14/17	16/19	15/18	14/16	11/13	12/17	18/21

IZRAČUNI STATISTIČNE VERJETNOSTI SORODSTVA

Predhodno verjetnost sorodstva (77) smo izračunali s pomočjo števila žrtev v grobišču, 7, in dobili rezultat 0,125.

Haplotip kromosoma Y

V **Preglednici XVII** so prikazani haplotipi kromosoma Y za tri moške žrtve in moško referenčno osebo 1. Opazili smo, da na lokusu DYS391 ni ujemanja med žrtvami in referenčno osebo, med njimi se število ponovitev osnovnega motiva na tem lokusu namreč

razlikuje za 1 (žrtve imajo alel 10, referenčna oseba pa alel 9), kar je posledica enostopenjske STR - mutacije (84). S pomočjo baze YHRD smo določili frekvenco haplotipa ob upoštevanju enostopenjske mutacije.

Za haplotip kromosoma Y smo LR določili s pomočjo podatkovne baze YHRD in sicer je vrednost za LR ob upoštevanju enostopenjske mutacije 2. To pomeni, da je 2-krat bolj verjetno, da haplotipi pripadajo isti paternalni liniji, kot da pripadajo različnim paternalnim linijam.

Avtosomska področja STR

Uspešno smo pridobili štiri različne avtosomske genetske profile, ki so za posamezni skeletni element in kot konsenzusni profili posamezne žrtve prikazani v *Preglednici XVIII*. Izmed treh ženskih skeletov smo bili uspešni pri tipizaciji skeleta 2, izmed moških pa smo pridobili profile iz stegenic 1, 2, 4, 5 in 6; stegnenica 2 pripada eni izmed moških žrtev, stegenici 1 in 6 drugi ter stegenici 4 in 5 tretji moški žrtvi. Dobljene avtosomske genetske profile smo primerjali z genetskima profiloma referenčnih oseb.

Oče referenčnih oseb 1 in 2

Med profilom moške stegenice 2 in profiloma referenčnih oseb smo potrdili ujemanje na vseh 15 lokusih STR. Sklepamo, da je žrtev, ki ji pripada stegnenica 2, biološki oče referenčnih oseb. Za analizirane lokuse STR smo izračunali LR, ki je $2,1 \times 10^9$, kar pomeni, da je tolikokrat večja verjetnost, da je žrtev biološki oče referenčnih oseb, kot da je njun oče naključno izbrana, sorodstveno nepovezana oseba iz slovenske populacije. Izračunana naknadna verjetnost sorodstva je 99,9999997 %. Potrdimo lahko, da gre za očeta referenčnih oseb 1 in 2.

S pomočjo LR haplotipa kromosoma Y, pri katerem smo prav tako opazili ujemanje, smo izračunali skupno verjetnostno razmerje LR_c , ki je $4,3 \times 10^9$, in skupno naknadno verjetnost sorodstva, ki je 99,9999998 %, ter tako povečali moč statističnega dokaza teh sorodstvenih vezi.

Stric 1 referenčnih oseb 1 in 2

Pri konsenzusnem profilu moških stegenic 1 in 6 smo s profilom referenčne osebe 1 zasledili ujemanje na 11 lokusih STR, s profilom referenčne osebe 2 pa na 13 lokusih STR. Sklepamo, da stegenici pripadata enemu izmed stricev. Za analizirane lokuse STR smo

izračunali LR, ki je $8,6 \times 10^7$, kar pomeni, da je tolikokrat večja verjetnost, da je žrtev stric referenčnih oseb, kot da je njun stric naključno izbrana, sorodstveno nepovezana oseba iz slovenske populacije. Izračunana naknadna verjetnost sorodstva je 99,999992 %. Potrdimo lahko, da gre za enega izmed stricev referenčnih oseb 1 in 2.

S pomočjo LR haplotipa kromosoma Y, pri katerem smo prav tako opazili ujemanje, smo izračunali skupno verjetnostno razmerje LRc, ki je $1,7 \times 10^8$, in skupno naknadno verjetnost sorodstva, ki je 99,999996 %, ter tako povečali moč statističnega dokaza teh sorodstvenih vezi.

Stric 2 referenčnih oseb 1 in 2

Pri konsenzusnem profilu moških stegenic 4 in 5 smo s profilom referenčne osebe 1 zasledili ujemanje na 12 lokusih STR, s profilom referenčne osebe 2 pa na 14 lokusih STR. Sklepamo, da stegenici pripadata enemu izmed stricev. Za analizirane lokuse STR smo izračunali LR, ki je $5,3 \times 10^6$, kar pomeni, da je tolikokrat večja verjetnost, da je žrtev stric referenčnih oseb, kot da je njun stric naključno izbrana, sorodstveno nepovezana osebo iz slovenske populacije. Izračunana naknadna verjetnost sorodstva je 99,9999 %. Potrdimo lahko, da gre za enega izmed stricev referenčnih oseb 1 in 2.

S pomočjo LR haplotipa kromosoma Y, pri katerem smo prav tako opazili ujemanje, smo izračunali skupno verjetnostno razmerje LRc, ki je $1,1 \times 10^7$, in skupno naknadno verjetnost sorodstva, ki je 99,99993 %, ter tako povečali moč statističnega dokaza teh sorodstvenih vezi.

Teta referenčnih oseb 1 in 2

Pri konsenzusnem profilu ženskega skeleta 2 smo s profilom referenčne osebe 1 zasledili ujemanje na 12 lokusih STR, s profilom referenčne osebe 2 pa na 13 lokusih STR. Sklepamo, da ženski skelet 2 pripada eni izmed tet. Za analizirane lokuse STR smo izračunali LR, ki je 2140, kar pomeni, da je tolikokrat večja verjetnost, da je žrtev teta referenčnih oseb, kot da je njuna teta naključno izbrana, sorodstveno nepovezana osebo iz slovenske populacije. Izračunana naknadna verjetnost sorodstva je 99,67 %. Statistični dokaz nima dovolj visoke verjetnosti, da bi lahko potrdil sorodstveno povezavo med žrtvijo in referenčnima osebama 1 in 2. Skupna naknadna verjetnost sorodstva namreč mora presegati vrednost 99,9% - le tako lahko potrdimo sorodstveno razmerje ali pozitivno identificiramo žrtev (77, 82, 83). Tako je pri teti (ženski skelet 2) potrebno za dokončno

identifikacijo v preiskavo vključiti dodatne avtosomske genetske označevalce, ki nam bodo omogočili doseganje verjetnosti 99,9%.

ZAKLJUČEK

V magistrski nalogi smo v prvem delu raziskovanja z analizo 168 skeletnih elementov, ki so pripadali trem različnim skeletom, poiskali tiste, ki so najprimernejši za identifikacijo žrtev 2. svetovne vojne. Pri tem smo kot kriterija za izbor glede na dobljene rezultate določili količino DNA v ng/g kosti in število uspešno pomnoženih lokusov STR. Kot najprimernejše glede na omenjena kriterija smo izbrali intermedialno klinasto kost, distalno falango palca noge, skočnico, dlančnice (I-V), stopalnice (I-V), skalnico in golenico. V skladu s študijo raziskovalcev Mundorff in Davorena smo tudi mi med najboljše uvrstili majhne kosti rok in nog, katerih uporaba v namen identifikacije žrtev ni v skladu s trenutno veljavnimi priporočili. Izmed vseh skeletnih elementov smo presenetljivo v splošnem najslabše rezultate pridobili iz zob in jih zato v nasprotju s trenutno veljavnimi priporočili označili kot najmanj primerne za identifikacijo žrtev, vendar bi lahko vzrok temu bila bistveno slabša ohranjenost zob kot kosti v tem grobišču, saj so rezultati preiskav zob pri ostalih slovenskih grobiščih, (93, 94) pogosto dali zelo dobre rezultate. Torej bi bilo potrebno obdelati različne skupine zob še pri žrtvah drugih grobišč in povzeti rezultate. Za vse tri skelete smo pridobili tudi avtosomske genetske profile. Slednje smo primerjali s profili eliminacijske zbirke in tako ob neujemanju izključili morebitno kontaminacijo z DNA oseb, ki so sodelovale v različnih fazah preiskave.

Smiselno je, da se trenutne in prihodnje študije še naprej usmerjajo v iskanje najprimernejšega skeletnega elementa za tovrstne analize, saj je zaradi vpliva mnogih okoljskih in individualno specifičnih dejavnikov izbor vzorcev težaven, napoved uspeha pa skorajda nemogoča, hkrati pa je v izogib časovni in finančni potratu dobrodošla vsakršna optimizacija.

V drugem delu raziskovanja smo na enak način kot v prvem delu obdelali kosti, izkopane iz grobišča Babna Gora, ki so pripadale sedmim žrtvam. S pomočjo dveh referenčnih oseb smo želeli identificirati žrtve, ki so bile z referenčnima osebama v sledečih sorodstvenih razmerjih: oče, trije strici po očetovi strani, dve teti po očetovi strani in žena enega izmed stricev – slednje zaradi genetske nepovezanosti z referenčnima osebama nismo mogli identificirati. Uspešno smo pridobili avtosomske genetske profile za štiri žrtve in sicer tri moške in eno žensko, ter haplotipe kromosoma Y za tri moške. Z izračunom statistične verjetnosti sorodstvenih povezav smo dokazali sorodstveno povezanost dveh referenčnih oseb in treh moških žrtev, ki smo jih identificirali kot očeta in dva strica referenčnih oseb.

Za žensko žrtev, katere profil smo pridobili, z računom nismo pridobili dovolj močnega statističnega dokaza, da bi lahko z gotovostjo trdili, da gre za teto referenčnih oseb. Za močnejši statistični dokaz bi morali analizirati in primerjati ter ovrednotiti več avtosomskih lokusov STR. Vse dobljene profile smo primerjali s profili eliminacijske zbirke in tako izločili možnost kontaminacije DNA žrtev z DNA oseb, ki so sodelovale v katerikoli stopnji raziskave.

VIRI

- (1) Iwamura ESM et al. Human identification and analysis of DNA in bones. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo* 2004;59(6):383-88.
- (2) Baum DA, Futuyma DJ, Hoekstra HE, Lenski RE, Moore JA, Peichel CL, Schuller D, Whitlock MC: *The Princeton Guide to Evolution*, Princeton University Press, Princeton, 2013:477-79.
- (3) Hofreiter M, Shapiro B: *Ancient DNA: Methods and Protocols*, Humana Press, New York, 2012.
- (4) Camposa PF, Craig OE, Turner-Walker G, Peacock E, Willerslev E, Gilbert MTP: DNA in ancient bone – Where is it located and how should we extract it? *Annals of Anatomy* 2012;194:7-16.
- (5) Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE: Buried Alive: How Osteoblasts Become Osteocytes. *Developmental Dynamics* 2006;235:176-190.
- (6) Siriboonpiputtanaa T, Rinthachaia T, Shotivaranona J, Peonimb V, Rerkamnuaychokea B: Forensic genetic analysis of bone remain samples. *Forensic Science International* 2018;284:167-175.
- (7) Zupanič Pajnič I: Molekularnogenetska identifikacija skeletnih ostankov. *Medicinski razgledi* 2013;52:213-34.
- (8) Higgins D, Austin JJ: Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: A Review. *Science and Justice* 2013;53:433-41.
- (9) Coulson-Thomas YM, Norton AL, Coulson-Thomas VJ, Florencio-Silva R, Ali N, Elmrghni S, Gil CD, Sasso GRS, Dixon RA, Nader HB: DNA and bone structure preservation in medieval human skeletons. *Forensic Science International* 2015;251:186–194.
- (10) Allen C, Harper V: *Laboratory Manual for Anatomy and Physiology*, 4th edition, Wiley, Hoboken, NJ, 2011:96-98.
- (11) Kendall C, Høier Eriksen AM, Kontopoulos I, Collins MJ, Turner-Walker G: Diagenesis of archaeological bone and tooth. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 2018;491:21-37.
- (12) Miloš A, Selmanović A, Smajlović L, Huel RLM, Katzmarzyk C, Rizvić A, Parsons TJ: Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. *Croatian Medical Journal* 2007;48(4):486-493.

- (13) Anđelinović Š, Sutlović D, Erceg Ivkošić I, Škaro V, Ivkošić A, Paić F, Režić B, Definis-Gojanović M, Primorac D: Twelve-year Experience in Identification of Skeletal Remains from Mass Graves. *Croatian Medical Journal* 2005;46(4):530-539.
- (14) Ludeman MJ, Zhong C, Mulero JJ et al.: Developmental validation of GlobalFiler™ PCR amplification kit: a 6-dye multiplex assay designed for amplification of casework samples. *Int J Legal Med* 2018;1-19.
- (15) Zupanič Pajnič I, Gornjak Pogorelc B, Balažic 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 extended European Standard Set of loci. *Croatian Medical Journal* 2012;53(1):17-23.
- (16) Mundorff A, Davoren JM: Examination of DNA yield rates for different skeletal elements at increasing post mortem intervals. *Forensic Science International: Genetics* 2014;8(1):55-63.
- (17) Andronowski JM, Mundorff AZ, Pratt IV, Davoren JM, Cooper DML: Evaluating differential nuclear DNA yield rates and osteocyte numbers among human bone tissue types: A synchrotron radiation micro-CT approach. *Forensic Science International: Genetics* 2017;28:221-218.
- (18) Hines DZC, Vennemeyer M, Amory S, Huel RLM, Hanson I, Katzmarzyk C, Parsons TJ. Prioritizing sampling of bone and teeth for DNA analysis in commingled cases. In: Adams BJ, Byrd JE. *Commingled Human Remains: Methods in Recovery, Analysis, and Identification*. Elsevier Science, Oxford, 2014: 275-305.
- (19) Ferreira STG, Kuser HH, Garrido RG, Trindade-Filho A, Paula KA, Galvão MF, Moraes AV: Floods and mudslides in the State of Rio de Janeiro and a plane crash in the Brazilian Amazon rainforest: a study of two different experiences in disaster victim identification (DVI). *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2011;3(1):516-517.
- (20) Ferreira STG, Garrido RG, Paula KA, Nogueira RC, Olivveira ES, Moraes AV: Cartilage and phalanges from hallux: alternative sources of samples for DNA typing in disaster victim identification (DVI). A comparative study. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2013;4(1):366-367.
- (21) Turner-Walker G. The chemical and microbial degradation of bones and teeth. In: Pinhasi R, Mays S: *Advances in Human Palaeopathology*. John Wiley and Sonds LTD, 2008: 1-29.

- (22) Schwartz TR, Schwartz EA, Mieszerski L, McNally L, Kobilinsky L: Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. *Journal of Forensic Sciences* 1991;36(4):979-990.
- (23) Higgins D, Kaidonis J, Austin J, Townsend G, James H, Hughes T: Dentine and cementum as sources of nuclear DNA for use in human identification. *Australian Journal of Forensic Sciences* 2011;43(4):287-295.
- (24) Mansour H, Krebs O, Sperhake JP, Augustin C, Koehne T, Amling M, Püschel K: Cementum as a source of DNA in challenging forensic cases. *Journal of Forensic and Legal Medicine* 2018;54:76-81.
- (25) Hansen HB, Damgaard PB, Margaryan A, Stenderup J, Lynnerup N, Willerslev E, Allentoft ME: Comparing Ancient DNA Preservation in Petrous Bone and Tooth Cementum. *PLoS ONE* 2017; 12(1):e0170940. doi: 10.1371/journal.pone.0170940.
- (26) Pilli E, Vai S, Caruso MG, D'Errico G, Berti A, Caramelli D: Neither femur nor tooth: Petrous bone for identifying archaeological bone samples via forensic approach. *Forensic Science International* 2018;283:144-149.
- (27) Rubio L, Martinez LJ, Martinez E, Martin de las Heras S: Study of Short- and Long-term Storage of Teeth and Its Influence on DNA. *J Forensic Sci* 2009;54(6):1411-1413.
- (28) Garcia AA, Mufioz I, Pestoni C, Lareu MV, Rodriguez-Calvo MS, Carracedo A: Effect of environmental factors of PCR-DNA analysis from dental pulp. *Int J Legal Med* 1996;109:125-129.
- (29) Gamba C, Jones ER, Teasdale MD, McLaughlin RL, Gonzalez-Fortes G, Mattiangeli V, Domoboróczki L, Kővári I, Pap I, Anders A, Whittle A, Dani J, Raczky P, Higham TFG, Hofreiter M, Bradley DG, Pinhasi R: Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory. *Nature Communications* 2014;5:doi:10.1038/ncomms6257
- (30) "Human tooth diagram-en.svg." Wikimedia Commons (KDS444), 29. 10. 2016. Dosegljivo na: https://en.wikipedia.org/wiki/Human_tooth#/media/File:Human_tooth_diagram-en.svg. Dostop: marec 2018.
- (31) Le Meng Bao C, Teo EY, Chong MSK, Liu Y, Choolani M, Chan JKY: Advances in Bone Tissue Engineering. In: Andrades JA: *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. IntechOpen, 2013: 599-614. doi: 10.5772/55916

- (32) OpenStax: Anatomy and Physiology: Chapter 6. Bone Tissue and the Skeletal System. OpenStax CNX, 26. 2. 2016. Dosegljivo na: <http://cnx.org/contents/14fb4ad7-39a1-4eee-ab6e-3ef2482e3e22@8.24> Dostop: marec 2018.
- (33) Butler JM: Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers, 2nd edition, Elsevier, ZDA, 2005: 86-90.
- (34) Jamieson A, Bader S: A guide to forensic DNA profiling, Wiley, Hoboken, NJ, 2016: 5-6, 15-18, 32-34, 37-38, 108-109, 115-117.
- (35) Goodwin W, Linacre A, Hadi S: An Introduction to Forensic Genetics, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England, 2007: 13, 51-55
- (36) Zupanič Pajnič I. Extraction of DNA from Human Skeletal Material. In: Goodwin W: Forensic DNA Typing Protocols. Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York, NY, 2016;1420:89-108.
- (37) Brown TA, Brown KA: Ancient DNA and the archaeologist. *Antiquity* 1992;66:10-23.
- (38) Graham EAM: DNA reviews: ancient DNA. *Forensic Sci Med Pathol* 2007;3:221-225.
- (39) Pääbo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N et al: Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet* 2004;28:645-679.
- (40) Rohland N, Hofreiter M: Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nat Protoc* 2007;2:1756-1762.
- (41) Cattaneo C, Craig OE, James NT, Sokol RJ: 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;42:1126-1135.
- (42) Salamon M, Tuross N, Arensburg B, Weiner S: Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:13783-13788.
- (43) Sampietro ML, Gilbert MTP, Lao O, Caramelli D, Lari M, Bertranpetit J et al: Tracking down human contamination in ancient human teeth. *Mol Biol Evol* 2006;23:1801-1807.
- (44) Gilbert MTP, Rudbeck L, Willerslev E, Hansen AJ, Smith C, Penkman KEH et al: Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *J Archaeol Sci* 2005;32:785-793.

- (45) Alonso A, Andelinovic S, Martin P, Sutlovic D, Erceg I, Huffine E 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;42:260-266.
- (46) Bender K, Schneider PM, Rittner C: Application of mtDNA sequence analysis in forensic casework for the identification of human remains. *Forensic Sci Int* 2000;113:103-107.
- (47) Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Eggmann U, Comey CT, Dirnhofer R: Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. *J Forensic Sci* 1991;36:1649-1661.
- (48) Loreille OM, Diegoli TM, Irwin JA, Coble MD, Parsons TJ: High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Sci Int Genet* 2007;1:191-195.
- (49) QIAGEN: EZ1 DNA Investigator Handbook, Fourth Edition, 2007. Dosegljivo na: www.qiagen.com Dostop: marec 2018
- (50) Gill P, Sparkes R, Fereday L, Werrett DJ: Report of the European Network of Forensic Science Institutes (ENSFI): formulation and testing of principles to evaluate STR multiplexes. *Forensic Sci Int* 2000;108:1-29.
- (51) Applied Biosystems: Phases of amplification in Quantifier[®] Duo DNA Quantification Kit User's Manual, 2008: 1-13.
- (52) Promega Corporation: PowerQuant[™] System Technical Manual, Madison, USA 2015.
- (53) Keer JT: Quantitative Real-Time PCR Analysis. In: Keer JT, Birch L: *Essentials of Nucleic Acid Analysis: A Robust Approach*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2008:132-166.
- (54) Clayton TM, Hill SM, Denton LA, Watson SK, Urquhart AJ: Primer binding site mutations affecting the typing of STR loci contained within the AMPFISTR SGM Plus kit. *Forensic Sci Int* 2004;139:255-259.
- (55) Radstrom P, Knutsson R, Wolffs P, Lovenklev M, Lofstrom C: Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Molecular Biotechnology* 2004;26:133-146.
- (56) QIAGEN: Investigator ESSPlex SE QS Kit Handbook, 2015.
- (57) Li R: *Forensic Biology*, Second Edition, Taylor & Francis Group, ZDA, 2016: 148, 162-166.

- (58) Wenz HM, Robertson JM, Menchen S et al.: High-Precision Genotyping by Denaturing Capillary Electrophoresis. *Genome Res.* 1998;8:69-80.
- (59) Rosenblum BB, Oaks F, Menchen S, Johnson B: Improved single-strand DNA sizing accuracy in capillary electrophoresis. *Oxford University Press* 1997;25(19):3925-3929.
- (60) QIAGEN: Investigator ESSplex Plus Kit Handbook, 2012.
- (61) Promega Corporation: PowerPlex® ESI 17 Pro System Technical Manual, 2017.
- (62) Promega Corporation: PowerPlex® Y23 System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers Technical Manual, 2017.
- (63) Applied Biosystems: AmpFISTR® NGMTM PCR Amplification Kit User's Guide, Life Technologies Corporation, 2010.
- (64) Ewinga MM, Thompsona JM, McLarena RS, Purperob VM, Thomasb KJ, Dobrowskic PA, DeGrootc GA, Romsosd EL, Stortsa DR: Human DNA quantification and sample quality assessment: Developmental validation of the PowerQuant System. *Forensic Science International: Genetics* 2016;23:166–177.
- (65) Opel K, Chung D, McCord BR: A study of PCR inhibition mechanisms using real-time PCR. *J Forensic Sci* 2010;55(1)25-33.
- (66) Progeny Genetics LLC.: Progeny Free Online Pedigree Tool. Dosegljivo na: <https://pedigree.progenygenetics.com/> Dostop: junij 2018
- (67) Chambers GK, MacAvoy ES: Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 2000;126:455-476.
- (68) Andersen J et al.: Report on the third EDNAP collaborative STR exercise. *Forensic Science International* 1996;78:83-93.
- (69) Budowle B et al.: CODIS and PCR-based short tandem repeat loci: law enforcement tools. In: *Second European Symposium on Human Identification*. Promega Corporation 1998:73-88.
- (70) Gill P et al.: Report of the European DNA profiling group (EDNAP): an investigation of the complex STR loci D21S11 and HUMFIBRA (FGA). *Forensic Science International* 1997;86:25-33.
- (71) Gill P et al.: Report of the European DNA profiling group (EDNAP) toward standardization of short tandem repeat (STR) loci. *Forensic Science International* 1994;65:51-59.

- (72) Gill P et al.: Report of the European Network of Forensic Science Institutes (ENSFI): formulation and testing of principles to evaluate STR multiplexes. *Forensic Science International* 2000;108:1-29.
- (73) Sullivan KM et al.: A rapid and quantitative DNA sex test – fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques* 1993;15:636-638.
- (74) Zupanič I, Balažič J, Komel R: Analysis of nine short tandem repeat (STR) loci in the Slovenian population. *Int J Legal Med* 1998;11(5):248-250.
- (75) 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):178-180.
- (76) Zupanič I: Uvedba preiskave DNA za prepoznavanje oseb in preverjanje sorodstvenih povezav v slovenski populaciji, magistrska naloga. Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 1999.
- (77) Brenner CH, Weir BS: Issues and strategies in the DNA identification of World Trade Center victims. *Theoret Popul Biol* 2003;63(3):173-178.
- (78) 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.
- (79) 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.
- (80) 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):125-140.
- (81) Willuwiet S, Roewer L: Y chromosome haplotype reference database (YHRD): Update. *Forensic Sci Int Genet* 2007;1(2):83-87.
- (82) 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.
- (83) 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.

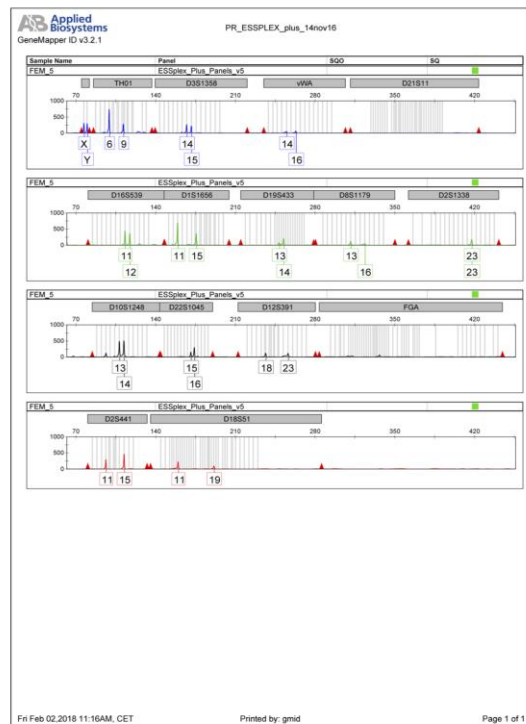
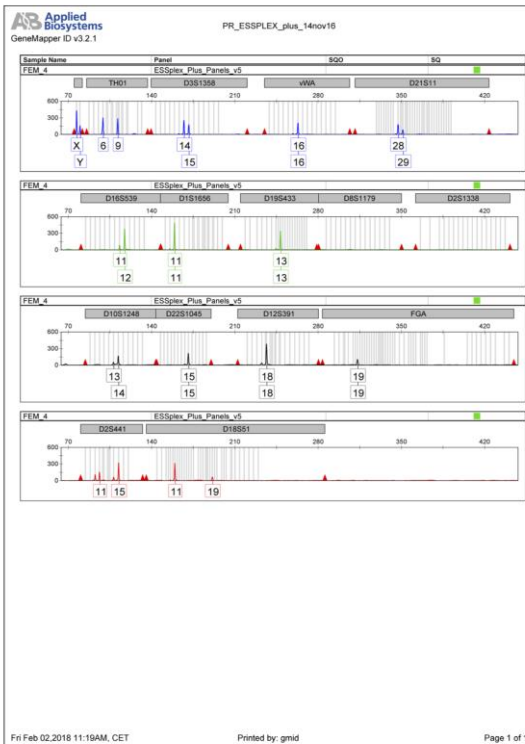
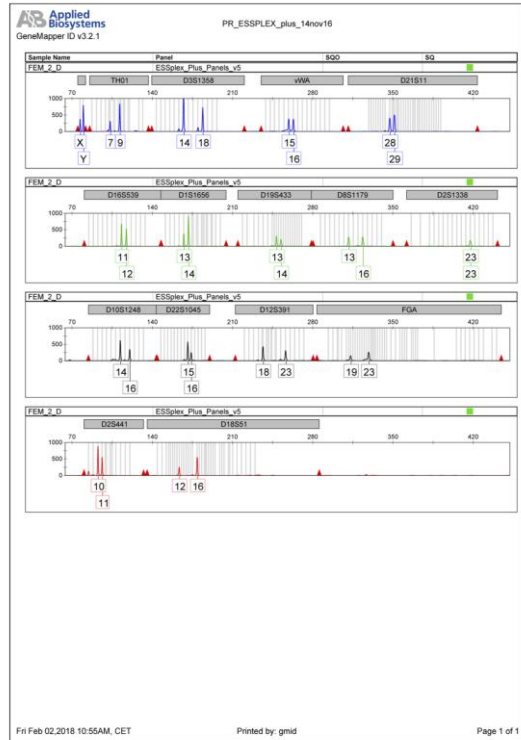
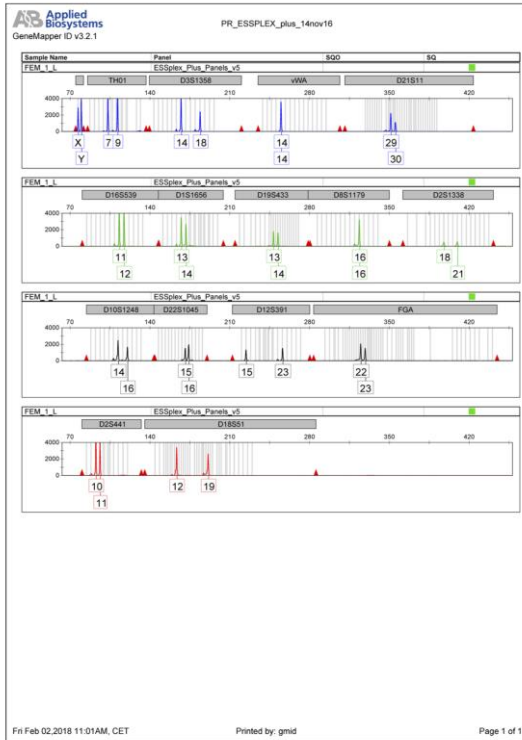
- (84) Y-DNA Step Mutations, The Family Tree DNA Learning Center. Dosegljivo na: <https://www.familytreedna.com/learn/y-dna-testing/y-str/one-step-mutation-two-step-mutation-etc/> Dostop: junij 2018
- (85) Balding D: Weight-of-evidence for Forensic DNA Profiles. John Wiley & Sons, West Sussex, England, 2005: 50-51.
- (86) Edson SM, Ross JP, Coble MD, Parsons TJ, Barritt SM: Naming the Dead – Confronting the Realities of Rapid Identification of Degraded Skeletal Remains. Forensic Sci Rev 2004;16(1):63-90.
- (87) Interpol: Disaster Victim Identification Guide. International Criminal Police Organization. Dosegljivo na: <https://www.interpol.int/INTERPOL-expertise/Forensics/DVI-Pages/DVI-guide> Dostop: avgust 2018
- (88) National Association of Medical Examiners: Standard Operating Procedures for Mass Fatality Management. Dosegljivo na: http://thename.org/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=38&Item_id=26 Dostop: avgust 2018
- (89) National Institute of Justice: Mass Fatality Incidents: A Guide for Human Forensic Identification. Department of Justice, Washington, 2005.
- (90) Mundorff AZ, Bartelink E, Marcash E: DNA preservation in skeletal elements from the World Trade Center disaster: recommendations for mass fatality management. J Forensic Sci 2009;54:739-745.
- (91) Promega: PowerPlex® Y23 System. Dostopno na: <https://promega.media/-/media/images/resources/figures/10400-10499/10436ma-w.svg?mw=1280> Dostop: avgust 2018
- (92) Zupanič Pajnič I, Zupanc T, Balažic J, Geršak ŽM, Stojković O, Skadrić I, Črešnar M: Prediction of autosomal STR typing success in ancient and Second World War bone samples. Forensic Science International: Genetics 2017;27:17-26.
- (93) Zupanič Pajnič I, Gornjak Pogorelc B, Balažic J, Zupanc T, Štefanič B: Highly efficient nuclear DNA typing of the World War II skeletal remains using three new autosomal short tandem repeat amplification kits with the extended European Standard Set of loci. Croatian Medical Journal 2012;53(1):17-23.
- (94) Zupanič Pajnič I: A Comparative Analysis of the AmpFISTR Identifier and PowerPlex 16 Autosomal Short Tandem Repeat (STR) Amplification Kits on the Skeletal

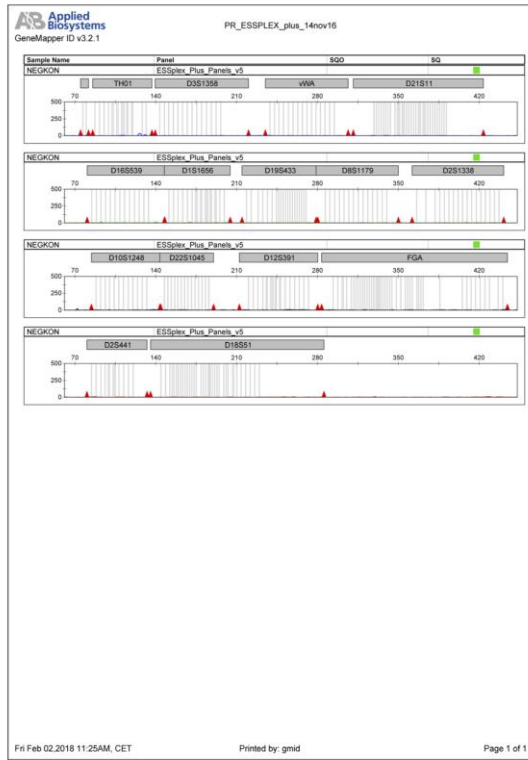
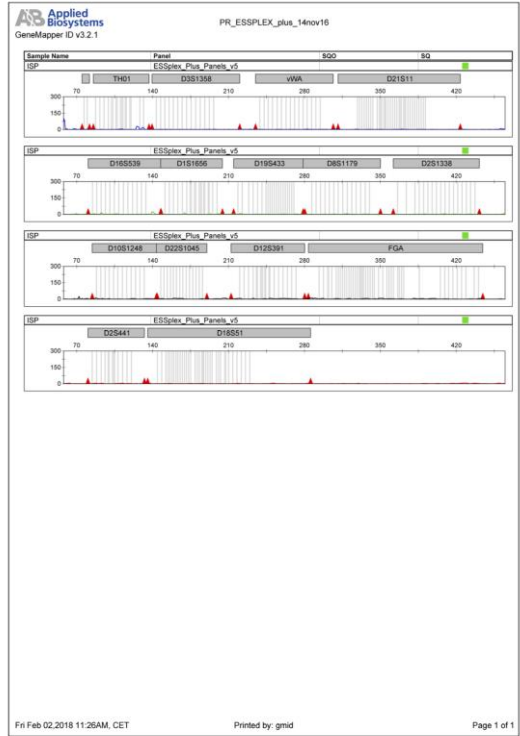
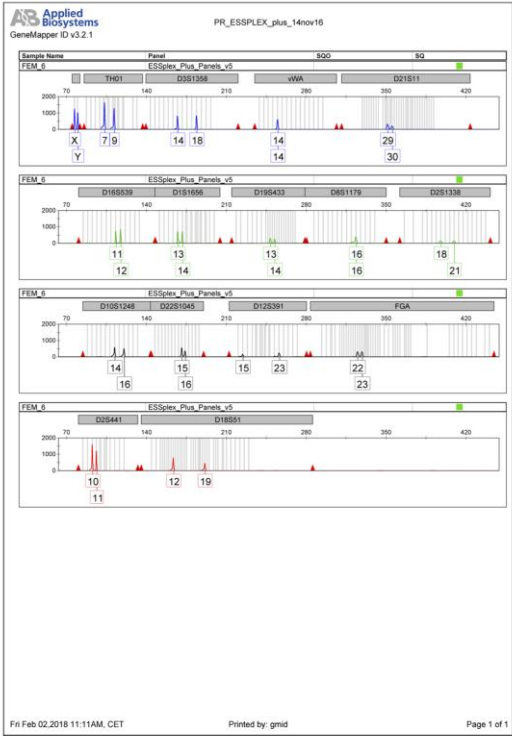
Remains Excavated from Second World War Mass Graves in Slovenia. *Rom J Leg Med* 2013;21:73-78.

(95) Poetsch M, Konrad H, Helmus J, Bajanowski T, von Wurb-Schwark N: Does zero really mean nothing?—first experiences with the new PowerQuant™ system in comparison to established real-time quantification kits. *Int J Legal Med* 2016;130:935-940.

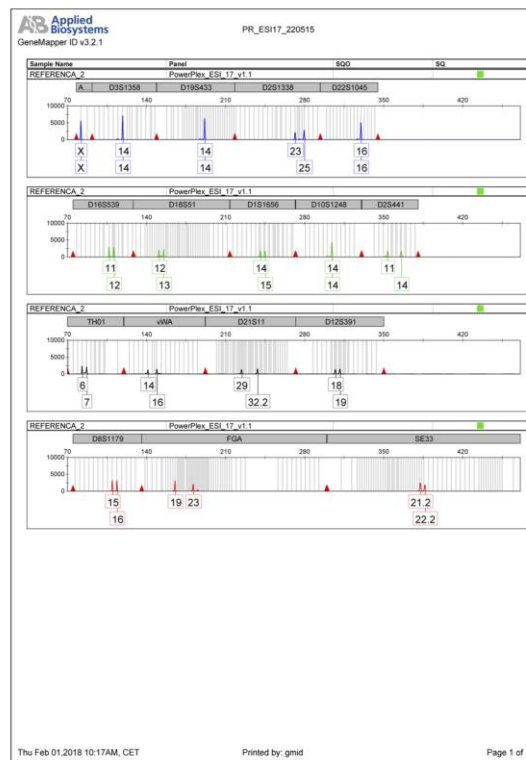
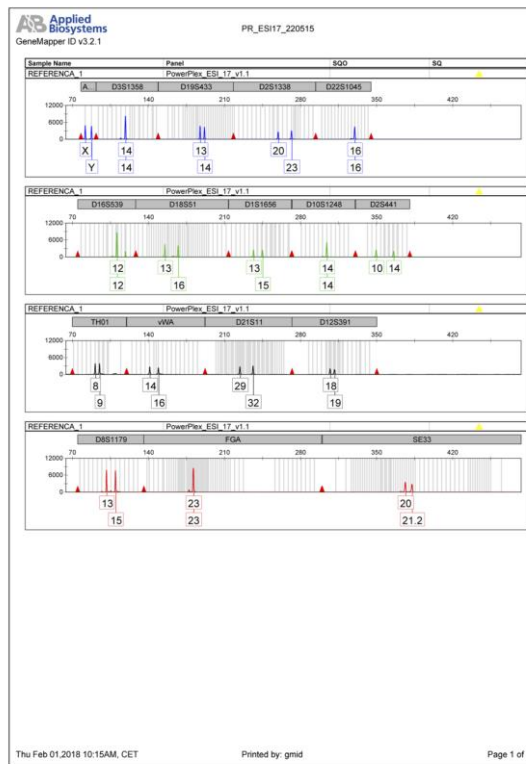
PRILOGE

Priloga 1: Elektroferogrami kosti iz moškega groba grobišča Babna Gora; leva stegnenica 1, desna stegnenica 2, stegnenica 4, stegnenica 5, stegnenica 6, izolacijska negativna kontrola (ISP) in negativna PCR-kontrola (NEGKON).





Priloga 2: Elektroferograma referenčnih oseb 1 in 2 za žrtve grobišča Babna Gora.



Priloga 3: Elektroferogrami skeleta 2 iz ženskega groba brobišča Babna Gora; desna stegnenica in golenica, levi zgornji kočnik 2, izolacijska negativna kontrola (ISP) in negativna PCR kontrola.

