

Primjena analize mitohondrijske DNA u forenzičnim znanostima i njen značaj za rješavanje slučajeva

Šimić Perutović, Anita

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University Department of Forensic Sciences / Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:227:402558>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-11**

SVEUČILIŠTE
U
SPLITU



SVEUČILIŠNI
ODJEL ZA
FORENZIČNE
ZNANOSTI

Repository / Repozitorij:

[Repository of University Department for Forensic Sciences](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA
FORENZIČNE ZNANOSTI**

**FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA
BIOLOGIJA**

DIPLOMSKI RAD

**PRIMJENA ANALIZE MITOHONDRIJSKE DNA U
FORENZIČNIM ZNANOSTIMA I NJEN ZNAČAJ ZA
RJEŠAVANJE SLUČAJEVA**

ANITA ŠIMIĆ PERUTOVIĆ

Split, rujan 2023.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA
FORENZIČNE ZNANOSTI**

**FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA
BIOLOGIJA**

DIPLOMSKI RAD

**PRIMJENA ANALIZE MITOHONDRIJSKE DNA U
FORENZIČNIM ZNANOSTIMA I NJEN ZNAČAJ ZA
RJEŠAVANJE SLUČAJEVA**

Mentor: prof.dr.sc. Damir Marjanović

Komentor: Josip Crnjac, prof. biol.

Studentica: Anita Šimić Perutović

Matični broj studentice: 494 /2019.

Split, rujan 2023.

Rad je izrađen u Laboratoriju za forenzičnu genetiku i biologiju pod nadzorom Josipa Crnjca, prof. biol.

u vremenskom razdoblju od veljače do kolovoza 2023. godine.

Datum predaje diplomskog rada: 01. rujan 2023.

Datum prihvaćanja rada: 08. rujan 2023.

Datum usmenog polaganja: 13. rujan 2023.

Povjerenstvo:

1. **doc.dr.sc. Snježana Štambuk**
2. **dr.sc. Nevena Aljinović**
3. **pof.dr.sc. Damir Marjanović**

SADRŽAJ

1. UVOD	2
1.1. DNA	2
1.2. Vrste DNA	4
1.2.1. Nuklearna DNA (nDNA)	4
1.2.2. Mitohondrijska DNA (mtDNA)	6
1.2.3. Kloroplastna DNA(cpDNA)	9
2. CILJEVI RADA	12
3. IZVORI PODATAKA I METODE	13
4. REZULTATI	14
4.1. Primjena mtDNA u forenzici	14
4.2. mtDNA u identifikaciji ljudi	14
4.2.1. Identifikacija skeletnih ostataka obitelji Romanov	17
4.2.1.1. Testiranje spola	19
4.2.1.2. Analiza mtDNA	20
4.2.2. Identifikacija posmrtnih ostataka kralja Richarda III	22
4.2.2.1. Određivanje spola posmrtnih ostataka	23
4.2.2.2. Srodstvo po muškoj liniji i analiza Y kromosoma	24
4.2.2.3. Utvrđivanje srodstva po ženskoj liniji i analiza mtDNA	26
4.2.2.4. Određivanje vjerojatnosti boje kose i očiju Richarda III	28
4.2.2.5. Statistička analiza	29
4.2.3. Identificiranje pojedinaca sekvenciranjem mtDNA iz zuba	29
4.2.3.1. Sekvenciranje mtDNA	30
4.2.3.2. Usporedba s poznatim sekvencama mtDNA	30
5. RASPRAVA	34
6. ZAKLJUČCI	36
7. LITERATURA	37
8. SAŽETAK	39
9. ŽIVOTOPIS	41

10. IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI.....	42
------------------------------------------------	-----------

1. UVOD

1.1. DNA

DNA je nevjerojatna molekula u kojoj je zapisan izgled gotovo svakog organizma na planetu i koja čini svakog od nas onakvim kakvi jesmo. DNA svih ljudi je 99,9% identična što nam govori da smo svi daleko više slični nego smo različiti.

Naša jedinstvenost, proizlazi upravo u 0,1% različitosti DNA koja sadrži varijacije, koje nam u kombinaciji s našim okolišem i socijalnim kontekstom daju naše sposobnosti, naše zdravlje, naše ponašanje.

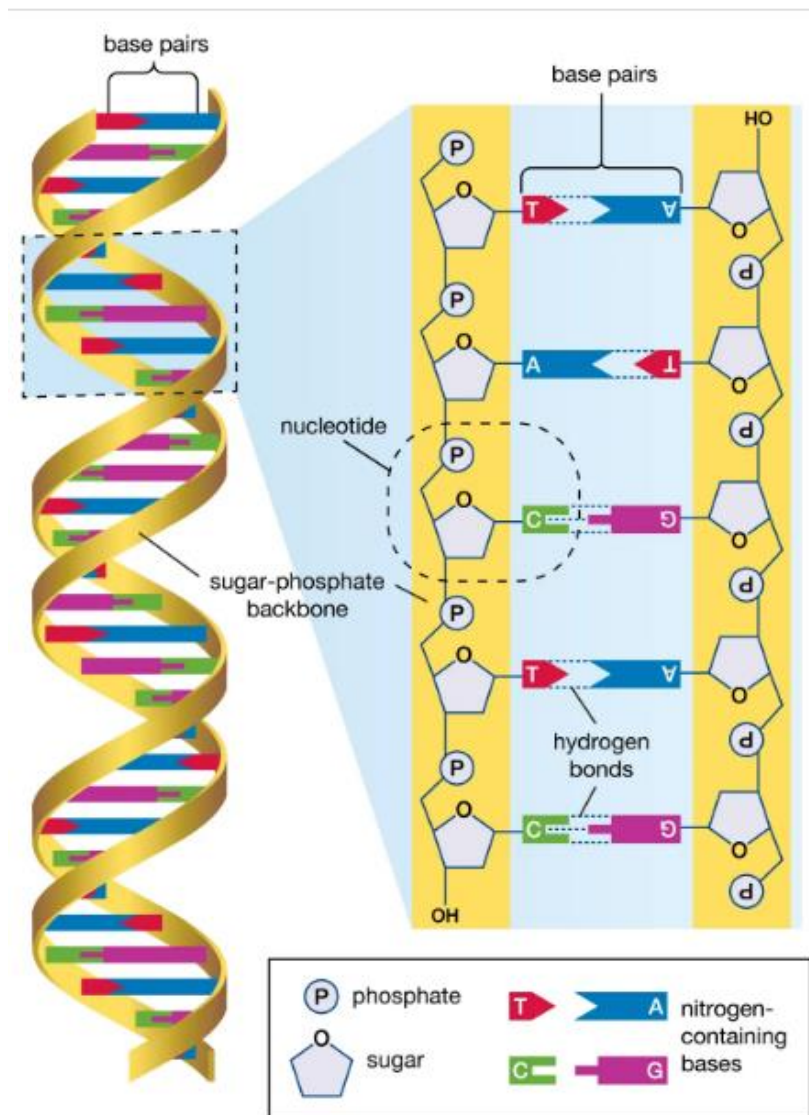
DNA ili deoksiribonukleinska kiselina je nasljedni materijal kod ljudi i gotovo svih drugih organizama. Skoro svaka stanica u tijelu osobe ima isti DNA. Većina DNA nalazi se u jezgri (gdje se naziva nuklearna DNA), ali mala količina DNA može se pronaći i u mitohondrijama (gdje se naziva mitohondrijska DNA ili mtDNA) (1).

Ljudska DNA sastoji se od oko 3 milijarde parova baza, a više od 99% tih baza je identično kod svih ljudi. Redoslijed ovih baza određuje informacije potrebne za izgradnju i održavanje organizma, slično načinu na koji se slova abecede pojavljuju određenim redoslijedom u obliku riječi i rečenica. Baze DNA spajaju se jedna s drugom kako bi formirale jedinice koje se nazivaju parovi baza (1).

Molekula DNA ima oblik dvostruke uzvojnice i nalazi se u kromosomima. Podjedinice DNA označavaju se kao nukleotidi. Svaki nukleotid sastoji se iz tri gradivna elementa: pet-ugljičnog šećera (deoksiriboze), fosfatne skupine, nukleotidnih baza koje sadržavaju dušik (adenin – A; timin – T; citozin – C i guanin – G) kao što je prikazano na slici 1. U dvostrukom lancu kemijskih baza adenin se spaja s timinom (povezani između sebe dvostrukim vodikovim vezama), te guanin s citozinom (povezani međusobno trostrukim vodikovim vezama) (2).

Značajna je primjena analize DNA u forenzičnim znanostima:

- kod istraživanja kriminalnih radnji,
- utvrđivanje identiteta i
- dokazivanje srodstva (2).



Encyclopædia Britannica, Inc.

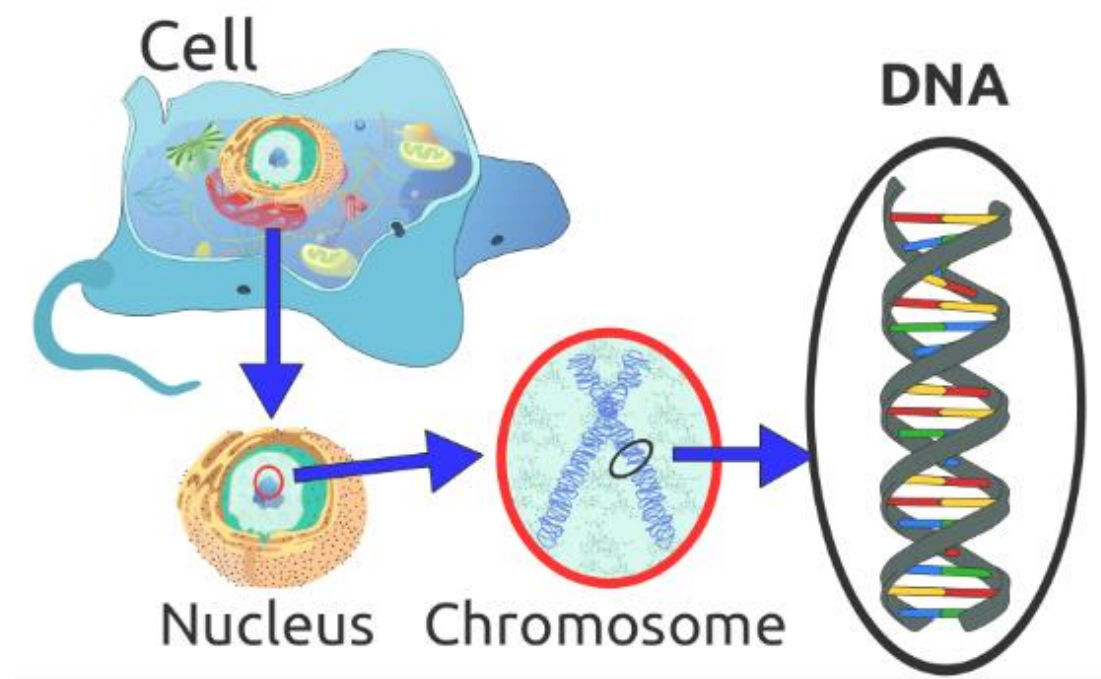
Slika 1. Građa i izgled ljudske molekule DNA
(izvor:<https://www.britannica.com/science/human-genome>)

1.2. Vrste DNA

U prirodi se, ovisno o položaju u stanici i tipu organizma javljaju tri oblika DNA molekule. To su: nuklearna DNA, mitohondrijska DNA i kloroplastna DNA. Nuklearna i mitohondrijska DNA nalaze se kod svih živih bića, dok kloroplastnu DNA nalazimo u stanicama biljaka.

1.2.1. Nuklearna DNA (nDNA)

Nuklearna DNA smještena je u jezgri stanice (slika 2.). Svaka ljudska stanica, izuzev crvenih krvnih stanica ima nucleus koji sadrži DNA, koja nosi genetičku informaciju. Sadržaj DNA nukleusa kod ljudi je podijeljen u 23 para kromosoma. Jedan kromosom od svakog od 23 para dolazi od jednog i drugog roditelja. Među ova 23 para kromosoma su 22 para autosoma i 1 par spolnih kromosoma.



Slika 2. Organizacija nuklearne DNA (izvor: <https://pediaa.com/difference-between-mitochondrial-dna-and-nuclear-dna/>)

nDNA se nasljeđuje od svakog roditelja i smatra se jedinstvenom za svakog pojedinca (osim za jednojajčane blizance). U analizi nDNA se, međutim, ne ispituje cijeli genom. Većina ljudskog genoma potpuno je ista kod svih pojedinaca, sa samo djelićem postotka nDNA koji se razlikuje od osobe do osobe. U forenzici se analiziraju samo one varijabilne regije i obično se ispituje oko 13 regija ili lokusa koji su vrlo varijabilni, a postoji vrlo mala vjerojatnost da će dvije osobe imati isti nDNA profil za sve te regije. Tih 13 lokusa činilo je tzv. CODIS lokuse i od 2017. godine preporuka je ispitivanja 20 lokusa (3, 4).

Samo 10% ljudskog genoma nosi genetičku relevantnu informaciju koja je bitna za svakog pojedinca. Čini se da ostala područja ljudskog genoma nisu predmet pritiska evolucije ili mehanizama selekcije, koji dosta variraju od jedne do druge osobe. Ovo je razlog nakupljanja mutacija – polimorfizama (SNPs) i rearanžiranja DNA (delecije, insercije i duplikacije) koji dovode do nastanka generacije genetskih različitosti u nekodiranim regijama. DNA polimorfizmi dijelom se sastoje iz ponavljajućih tandemskih sekvenci (STR) prisutnih u specifičnim područjima (loci) genoma. Broj ovih ponavljanja varira od jedne do druge osobe uzrokujući varijacije u veličini i alelima. Kako je svaki specifični lokus prisutan u datom paru kromosoma (izuzev za XY par spolnih kromosoma) svaka osoba ima 1 alel naslijeđen od majčinog i 1 od očevog kromosoma. Kao rezultat moguće je kroz analizu autosomalnih STR-ova, ne samo identificirati (s visokim postotkom vjerojatnosti) osobu iz DNA uzorka nego i testirati i utvrditi rodbinsku vezu.

Y-kromosomalni markeri (STR i SNP) se također koriste za humanu identifikaciju u forenzičnim slučajevima i majčinsko-očinskim vezama, kao i u studijama o ljudskoj evoluciji. Ovi markeri su od velike važnosti jer su haploidni i nasljeđuju se po ocu. Činjenica da ne podliježu rekombinacijama daje mogućnost direktnog utvrđivanja muške loze (5).

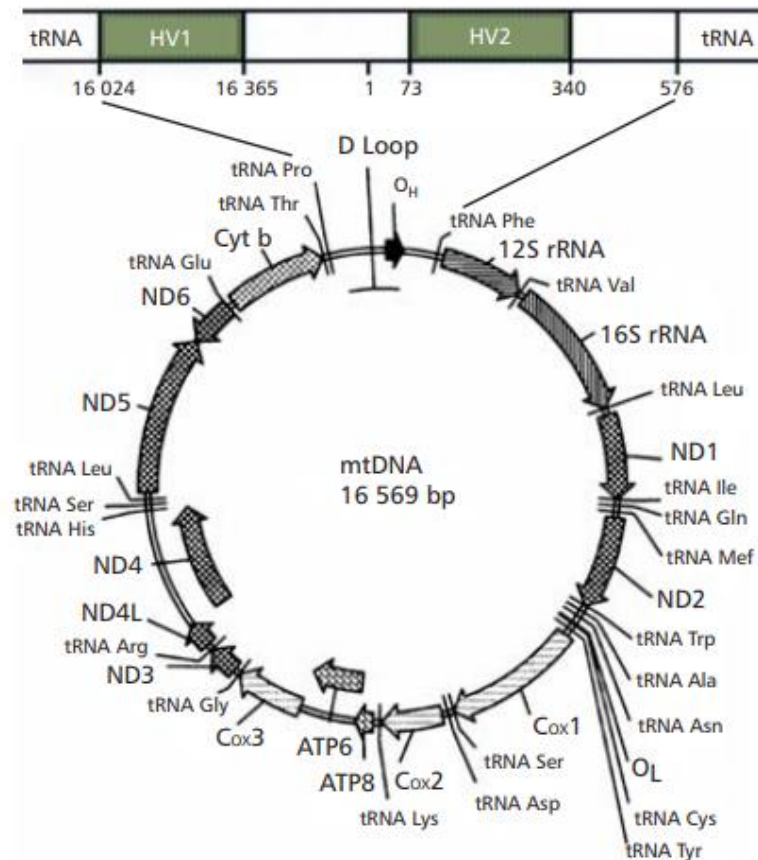
1.2.2. Mitohondrijska DNA (mtDNA)

Svaka ljudska stanica ima “drugi” genom, otkriven u organelama s ulogom stvaranja stanične energije, mitohondrijama. Svaki mitohondrij sadrži nekoliko kopija vlastitog genoma. Po stanici postoji nekoliko stotina do nekoliko tisuća mitohondrija. Cjelokupna sekvenca ljudskog mitohondrijskog genoma (od 16569 nukleotida) utvrđena je 1981.g.

Mitohondrijska DNA (mtDNA) sadrži 37 gena, od kojih su svi uključeni u proizvodnju energije i njeno skladištenje u obliku adenzin trifosfata (ATP). Osim nasljeđivanja preko majke i nedostatka rekombinacije (zbog nedostatka očeve mtDNA s kojom bi se rekombinirala) dva su aspekta koja mtDNA čine posebno korisnom za analizu forenzičnih i arheoloških materijala:

- 1) njihov veliki broj kopija što povećava šanse za pronalazak nekoliko molekula u slučaju molekularne štete koja može utjecati na forenzične ili stare biološke uzorke;
- 2) činjenica da akumulira mutacije brže od nuklearne DNA, što rezultira sposobnošću razlikovanja pojedinaca ili populacija.

Kod analize mtDNA koriste se dvije hipervarijabilne (HV) regije – kontrolne regije budući da sadrže najveći stupanj polimorfizma (slika 3.) (5).

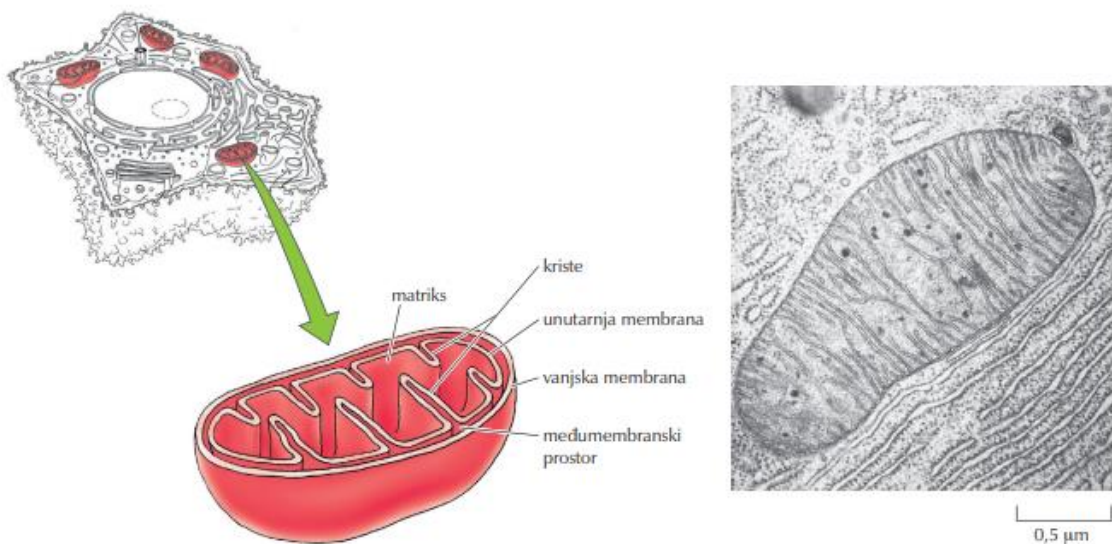


Slika 3. Shema mitohondrijskog genoma u čovjeka (izvor: Primorac, D., Marjanović, D., Lauc, G., Ćurić, G., Gornik, I., Anđelinović, Š., ... & Asplen, C. (2008). *Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu*. Medicinska naklada.

Mitochondriji su organeli kojima je osnovna zadaća proizvodnja metaboličke energije u stanicama. Energija nastaje razgradnjom masnih kiselina i ugljikohidrata koja se u procesu oksidativne fosforilacije pretvara u ATP. Mitochondrije se posebno ističu među staničnim organelama jer imaju vlastitu DNA, a čija je zadaća kodiranje transportne RNA (tRNA), ribosomalne DNA (rDNA) i neke od proteina mitochondrija (6).

Grada mitochondrija

Mitochondriji su okruženi dvostrukim membranama (vanjska i unutarnja membrane) između kojih se nalazi intermembranski prostor. Unutarnju membranu tvori nabore – kriste. Unutrašnjost mitochondrija označava se kao matriks (slika 4.). U matriksu je smješten genom mitochondrija (mitohondrijska DNA – mtDNA) (6).



Slika 4. Struktura mitohondrija (izvor: Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2010). *Stanica: molekularni pristup*. Medicinska naklada.)

Genomi mitohondrija su male kružne molekule DNA, i zastupljene su u velikom broju kopija u jednoj organeli. Mitohondrijski genom čovjeka sadrži 16kb i kodira 13 proteina bitnih za procese oksidativne fosforilacije i elektron transportni lanac. DNA mitohondrija, kao i DNA nukleusa, izložene su mutacijama. Budući da svi mitohondriji oplodjenih jajnih stanica potječu od oocite, nastale mutacije u DNA mitohondrija prenose se u narednu generaciju isključivo po majčinoj liniji (6).

Jedna stanica može sadržavati i do 1000 mitohondrija, od kojih svaki mitohondrij nosi 2 – 10 kopija mtDNA. mtDNA ima daleko veću stopu mutacije u odnosu na nuklearnu DNA, što se može objasniti činjenicom nedostatka mehanizama za oporavak DNA i slaboj preciznosti DNA polimeraze. Genom mtDNA potpuno je sekvenciran i ne sadrži intronske sljedove. Dva segmenta kontrolne regije genoma mtDNA su posebno specifična jer se odlikuju većinom varijacija sekvenci među pojedincima. Te regije se označavaju kao hipervarijabilne regije (HV).

Hipervarijabilna regija 1 (HV1) ima položaj 16 024 do 16 365 bp, dok hipervarijabilna regija 2 (HV2) ima položaj 73 do 340 bp. Upravo su ove dvije regije važne i bitne u svrhu forenzičnih testiranja zbog svoje male veličine i relativno velike međuljudske varijabilnosti.

U odnosu na nuklearnu DNA, mtDNA se nasljeđuje isključivo s majčine strane. Samim time su mutacije sekvenca mtDNA braće, sestara i svih srodnika po majčinoj liniji potpuno identične. U forenzičnim slučajevima, ova specifična karakteristika može biti od velike pomoći, kao što je analiza ostataka nestale osobe gdje poznati srodnici po majčinoj liniji mogu dati neke referentne uzorke za izravnu usporedbu s ispitivanim uzorkom mtDNA. Zbog nedostatka rekombinacije, srodnici po majčinoj liniji, nekoliko generacija unazad mogu poslužiti kao referentni uzorci.

Proces interpretacije rezultata sekvenciranja DNA pojednostavljuje haploidna i monoklonska priroda DNA. U pojedinim slučajevima kod nekih osoba se susreće pojava heteroplazme. Kod takvih pojedinaca uočava se prisustvo više od jednog detektabilnog tipa mtDNA. I kada se uoči obično se razlikuje u jednoj bazi, u HV1 ili HV2. U slučajevima pojave heteroplazme vrši se pažljiva analiza svih poznatih uzoraka s ispitivanim uzorkom kako bi se otklonile eventualne poteškoće pri interpretaciji rezultata (7).

Tipizacija mtDNA, posljednjih 25 godina, u forenzici ima širu primjenu, a koristi se kod:

- identifikacije ljudi u nasilnim zločinima,
- lakšim zločinima,
- terorističkim napadima,
- masovnim katastrofama i
- u slučajevima nestalih osoba (7).

Testiranje i analiza mtDNA može uspješno pomoći u kriminalističkim istragama u slučajevima s ograničenim biološkim dokazima, kao što su telogene dlake i degradirani skeletni ostatci. Analiza mtDNA ima sve veću primjenu u forenzičnim ispitivanjima u mnogim zemljama (8).

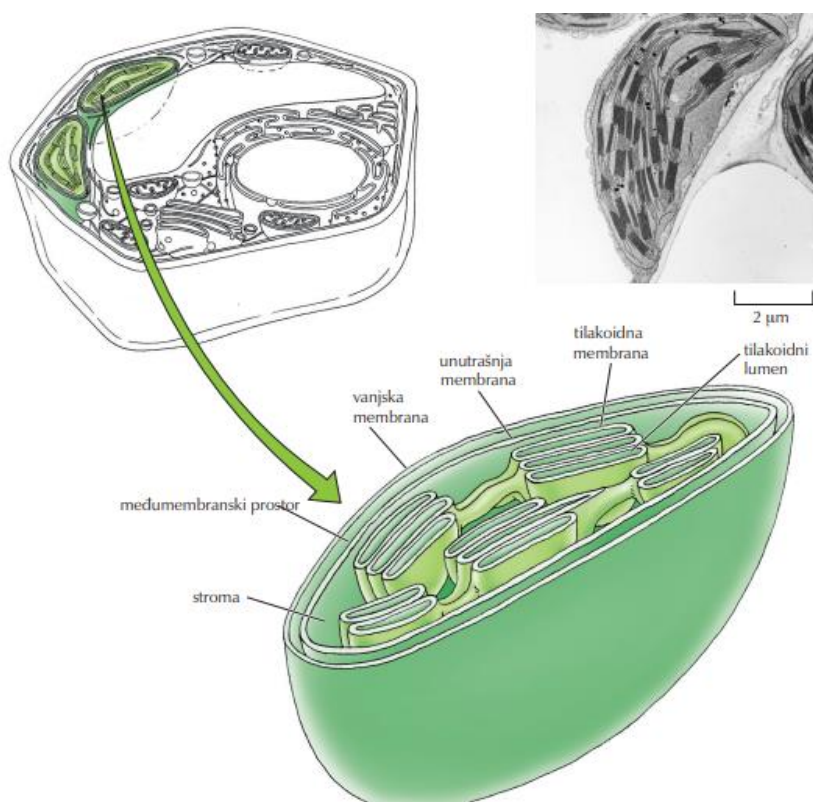
1.2.3. Kloroplastna DNA(cpDNA)

Kloroplasti su organeli prisutni isključivo u biljnim stanicama. Osnovna zadaća im je obavljanje fotosinteze. Kao i mitohondriji sadržavaju svoj vlastiti genetički materijal. Kloroplasti su velike organele obavijene dvostrukom membranom (ovojnica kloroplasta) (slika 5.). Sadrže i treći unutarnji sustav membrana (tilakoidna membrana). Unutar ovojnice (izvan tilakoidne membrane)

nalazi se stroma kloroplasta. Genom kloroplasta (slika 6.) sastoji se iz kružnih molekula DNA koje su prisutne u velikom broju kopija u svakoj organeli (6).

Veličina genoma cpDNA kreće se od oko 120000 do 247000 nukleotida. Svaki od kloroplasta sadrži od oko 22 do 900 kopija cpDNA i svaki od njih kodira 123 gena. To uključuje četiri gena za rRNA, 20 gena za ribosomalne protein, 30 gena za tRNA, mnoge fotosintetske protein, šest od devet gena za ATP-azu i kloroplastnu RNA polimerazu (9).

Većina proteina kloroplasta kodirana je od strane jezgre. Ribosomi kloroplasta sastoje se iz 52 proteina, ali samo 19 od njih kodirano je genomom plastida (9).



Slika 5. Struktura i građa kloroplasta (izvor: Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2010). *Stanica: molekularni pristup*. Medicinska naklada.)

cpDNA se nasljeđuje putem majčinske nasljedne linije kod većine biljaka cvjetnjača, biparentalno kod samo nekoliko njih, dok nasljeđivanje preko očeve nasljedne linije susrećemo kod biljaka golosjemenjača (9).

2. CILJEVI RADA

1. Prikazati važnost i primjenu mtDNA u forenzičnim znanostima
2. Prikazati primjenu mtDNA kod identifikacije ljudi kroz tri različita slučaja
3. Navesti prednosti primjene mtDNA u odnosi na ostale vrste DNA
4. Navesti i prikazati moguća ograničenja primjene mtDNA u forenzičnim istragama

3. IZVORI PODATAKA I METODE

- U ovom radu planira se koristiti pregled najnovije trenutno dostupne literature
- Kroz tri različita slučaja deskriptivnom metodom prikazat će se primjena mtDNA u forenzičnim znanostima, ali i moguća ograničenja njene primjene
- Prilikom pisanja ovog rada korištena je metoda usporedbe i analize podataka na prikazanim slučajevima

4. REZULTATI

4.1. Primjena mtDNA u forenzici

Veliki broj kopija mtDNA, nedostatak rekombinacija i matrilinearno nasljeđivanje, čini ovaj ekstranuklearni genom poželjnim u forenzici. Tipizacija mtDNA postala je rutina u forenzičnoj biologiji i koristi se za analizu starih kostiju, zubi, dlaka i drugih bioloških uzoraka u kojima je sadržaj nuklearne DNA nizak. Zbog velikog broja kopija molekula mtDNA u stanici, tipizacija mtDNA je posebno povoljna, u usporedbi s nuklearnom DNA, za određene vrste forenzičnih analiza.

U slučajevima kada je količina ekstrahirane DNA vrlo mala ili degradirana, veća je vjerojatnost da će se rezultat tipizacije mtDNA dobiti tipiziranjem mtDNA u odnosu na tipiziranje polimorfničkih markera koji se nalaze u jezgri DNA. Osim kostiju i zuba kao izvora za analizu, dlake također sadrže mtDNA, a rezultati se mogu dobiti od samo 1-2 cm jedne vlasi.

Sekvenciranje mtDNA, također je jedan od osnovnih i primarnih analitičkih alata koji se koristi za identifikaciju pojedinaca iz kostiju pronađenih ratnih žrtava. Osim toga, analiza mtDNA može biti korištena i u evolucijskim i antropološkim studijama, uključujući recimo analize 7000 godina starog moždanog tkiva i ostatke neandertalaca (12).

4.2. mtDNA u identifikaciji ljudi

Za forenzične analize uspoređuju se sekvence mtDNA referentnog uzorka i uzorka koji predstavlja pronađeni dokaz. Ukoliko su promatrane sekvence različite u svakom pogledu, može se zaključiti da ne potječu iz istog izvora. Ako su sekvence mtDNA identične, uzorci se ne mogu isključiti jer kao takvi imaju isto podrijetlo ili potječu od iste majčine loze. Isto tako, uzorci se ne mogu isključiti ukoliko se uočava heteroplazma na istim pozicijama kod oba ispitivana uzorka. Kada je jedan uzorak heteroplazmatski a drugi homoplazmatski a oba dijele bar jednu vrstu mtDNA, uzorci se ne mogu isključiti jer kao takvi mogu imati isto podrijetlo. Uzorke mtDNA s jednom baznom razlikom neophodno je dalje evaluirati, s obzirom na njihovu stopu mutacije (12).

Primjena analize mtDNA u identifikaciji ljudskih ostataka otvorila je put za primjenu mtDNA analize u forenzičkom kriminalističkom radu na slučajevima. Prvi slučaj u kojem su rezultati mtDNA predstavljeni sudu u SAD-u bio je slučaj države Tennessee protiv Paula Williama Warea

u kolovozu 1996. Ovaj slučaj odnosio se na povezanost stidne dlake osumnjičenika g. Ware koja se nalazila u grlu četverogodišnjeg ženskog djeteta. Osumnjičenik je kasnije osuđen za silovanje i ubojstvo. Od tada je mtDNA korištena u više od četiri stotine forenzičkih slučajeva, međutim, vrlo malo njih je objavljeno (13).

Mnogobrojni su primjeri primjene mtDNA kod identifikacije ljudi. U tablici 1 prikazane su neke od objavljenih publikacija.

Prva uspješna primjena tipizacije mtDNA spominje se u radu Stoneking iz 1991.g. Riječ je o slučaju koji se odnosio na individualnu identifikaciju skeletnih ostataka. Ovo je bio slučaj trogodišnjeg djeteta koje je nestalo iz obiteljske kuće u listopadu 1984.g. U ožujku 1986.g. skeletni ostatci djeteta pronađeni su u pustinji, 2 milje od prebivališta. Uporabom hibridizacije s 23 oligonukleotidne sonde specifične za sekvencu (SSO) ciljajući devet regija HV1 i HV2 na kontrolnoj regiji, otkriveno je da uzorci kostura i majke dijele iste tipove mtDNA. Ovo je potvrdilo da spomenuti pronađeni skeletni ostatci pripadaju nestalom djetetu.

Drugi poznati primjer uporabe mtDNA kod identifikacije ljudi potječe iz 1990.g. Na otvorenom polju otkriveno je tijelo žene u podmakloj fazi raspadanja. Iako je bilo nemoguće identificirati ostatke analizom odjeće i otiskom prstiju osobe, njezino zubalo bilo je u skladu sa starim zubnim kartonom nestale osobe iz iste regije. Izuzeti su uzorci fragmenata petne kosti i fibule, te uzorci kose i kože i dostavljeni za DNA analizu. Izuzet je i uzorak krvi navodne sestre pokojnice. Pokušalo se identificirati visoko raspadnute ostatke leša, amplificirajući i izravno sekvencirajući 2 hipervarijabilna segmenta unutar HV1 i HV2 u mtDNA. Rezultat je pokazao da ne postoje razlike između uspoređivanih sekvenci, u uzorcima kosti leša i u krvi navodne sestre što je ukazivalo da su bile sestre.

Najpoznatija studija loze pomoću sekvenciranja mtDNA odnosi se na identifikaciju cara Nikolaja II. Uspoređivane su sekvence HV1 i HV2 fragmenata mtDNA dobivene iz navodnih kostiju cara s onima živućih carevih rođaka po majčinoj nasljednoj liniji, grofice Xenie Cheremeteff – Sfiri i vojvode od Fife. Analize su pokazale da su promatrani nizovi bili vrlo slični, što je potvrdilo hipotezu da ostatci kostiju zaista pripadaju caru Nikolaju II (7).

Tablica 1. Primjeri objavljenih publikacija slučajeva primjene mtDNA kod identifikacije ljudi (izvor: Amorim, A., Fernandes, T., & Taveira, N. (2019). Mitochondrial DNA in human identification: a review. *PeerJ*, 7, e7314.)

Reference/Year	Studied samples	mtDNA studied regions	Used methodologies	Reference samples	Results
Stoneking M, Hedgecock D, Higuchi RG, Vigilant L, Erlich HA. Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. <i>Am J Hum Genet.</i> 1991;48(2):370-82.	Skeletal remains of a human child, found in 1986	HVI, HVII	PCR for amplification Hybridization with oligonucleotide probes for sequence determination	Parents of a 3-year-old child disappeared from home in 1984	Identical mtDNA sequence in skeletal remains and sample of the 3-year-old child mother Positive ID
Sullivan KM, Hopgood R, Gill P. Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA. <i>Int J Legal Med.</i> 1992;105(2):83-6.	Body of a female, in an advanced state of decomposition discovered in 1990	HVI, HVII	PCR for amplification Sanger sequencing	Blood sample from a sister of a deceased female at the same region	No differences were observed between the corpse and blood from the putative sister Positive ID
Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, et al. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. <i>Nat Genet.</i> 1994;6(2):130-5.	Nine skeletons found in a grave in Ekaterinburg, Russia, 1991	HVI, HVII	PCR for amplification Sanger sequencing	Blood sample from Gt. Gt. Grandson of Louise of Hesse-Cassel and from Gt. Gt. Granddaughter of Louise of Hesse-Cassel	Exact sequence between putative Tsarina Alexandra and putative three children. Exact mtDNA results between putative Tsar Nicholas II and two living maternal relatives of the Tsar
Ivanov PL, Wadhams MJ, Roby RK, Holland MM WV& PT. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. <i>Nat Genet.</i> 1996;12(4):17-20.	Skeleton of putative Tsar Nicholas II	HVI, HVII	PCR for amplification Sanger sequencing	Skeleton of Grand Duke of Russia Georgij Romanov (Tsar's brother) Blood sample from Countess Xenia Cheremeteff-Sfiri (maternal Tsar's relative)	Establishment of the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II
Deng YJ, Li YZ, Yu XG, Li L, Wu DY, Zhou J, et al. Preliminary DNA identification for the tsunami victims in Thailand. <i>Genomics, Proteomics Bioinforma.</i> 2005;3(3):143-57.	258 tooth samples from killed people at the 2004 Southeast Asia Thailand Tsunami	HVI, HVII	PCR for amplification Sanger sequencing	200 relatives of the tsunami victims	200 tsunami victims have been identified, including both Thai nationals and foreign tourists from several nations
Rios L, Garcia-Rubio A, Martinez B, Alonso A, Puente J. Identification process in mass graves from the Spanish Civil War II. <i>Forensic Sci Int.</i> 2010;219(1-3).	Skeletal remains exhumed from a mass grave from the Spanish Civil War (1936-1939)	HVI, HVII	PCR for amplification Sanger sequencing	Sister of the youngest person presumptively known to be buried in the grave	Match between mtDNA profiles of the biologically youngest skeleton and the sister of the youngest person presumptively known to be buried in the grave
Piccinini A, Coco S, Parson W, Cattaneo C, Gaudio D, Barbazza R, et al. World war one Italian and Austrian soldier identification project: DNA results of the first case. <i>Forensic Sci Int Genet.</i> 2010;4(5):329-33.	Remains of missing soldiers occasionally found during excavations	HVI, HVII	PCR for amplification Sanger sequencing	Offspring of the Italian soldier Libero Zagni Tauro	Both mtDNA and Y-STR data showed clear exclusion scenarios between the human remains and the reference samples
King TE, Fortes GG, Balesque P, Thomas MG, Balding D, Delser PM, et al. Identification of the remains of King Richard III. <i>Nat Commun.</i> 2014;5:1-8.	Skeleton excavated at the presumed site of the Grey Friars friary in Leicester, 2012	Whole mitochondrial genome	PCR for amplification Massive parallel sequencing	Saliva samples of the modern relatives of Richard III	Positive mtDNA match between the only known female-line of Richard III and studied modern relatives of Richard III

4.2.1. Identifikacija skeletnih ostataka obitelji Romanov

Jedan od najpoznatijih primjera primjene mtDNA je onaj o identifikaciji skeletnih ostataka koji su pripadali obitelji Romanov (slika 7.). Prikaz ovog slučaja potkrijepljen je forenzičnim dokazima koje je 1918.-1919. god. prikupio Nikolaj Sokolov (bjeloruski monarhistički istražitelj). Radi se o dosjeu u sedam tomova koji je postao osnova za povijesnu verziju sudbine obitelji Romanov. Naime, u plitkom grobu u Ekaterinburgu u Rusiji, u srpnju 1991.god. pronađeno je devet kostura. Ruski forenzičari su ih privremeno identificirali kao ostatke posljednjeg cara, carice, troje od njihovo petoro djece, kraljevskog liječnika i troje sluga (14).



Slika 7. Obitelj Romanov, 1913.god.

(Izvor: <https://www.nationalgeographic.com/history/history-magazine/article/romanov-dynasty-assassination-russia-history>)

Službeni zapisi o sudbini ruske kraljevske obitelji Romanov su oskudni, ali je poznato da su prije smrti bili zatvoreni u kući Ipatijev u Ekaterinburgu na Uralu u Središnjoj Rusiji. Vjeruje se da su nedugo nakon noći 16. srpnja 1918.god. car Nikola II, njegova supruga, carica Aleksandra, njihove

četiri kćeri, Olga, Tatjana, Marija i Anastazija i njihov sin jedinac Aleksej, otjerani u podrum zajedno s troje njihovih sluga i obiteljskog liječnika Eugenyja Botkina. Ustrijelio ih je boljševički streljački vod, iako je nekoliko žrtava navodno nasmrtno izbodeno nožem jer ih pucnjava nije uspjela ubiti. Tijela su zatim stavljena na kamion s namjerom da budu bačena u rudarsko okno. Budući da se kamion tijekom putovanja pokvario, počinitelji ovog zločina stavljali su žrtve u iskopanu jamu na cesti, a da bi se otežala identifikacija, u otvoreni grob bačena je sumporna kiselina. Nakon toga, kamion je vožen unatrag-naprijed preko mjesta kako bi se sravnilo područje (14).

Međutim, povijesna verzija događaja nikada nije potvrđena. Pozivajući se na arhivske materijale i fotografije, koji su ukazivali na groblje, dva ruska povjesničara amatera objavili su da su otkrili zajedničku grobnicu otprilike 20 milja od Ekaterinburga. Slijedom navedenog, ruska vlada odobrila je službenu istragu kojom je koordinirao glavni forenzički medicinski istražitelj Ruske Federacije (14).

Pronađena je grobnica koja se sastojala od plitke jame (manje od 1m dubine) koja je sadržavala ljudske skeletne ostatke. Iako su kosti bile teško oštećene, ipak je bilo moguće identificirati devet leševa. Na svim kosturima uočeni su tragovi nasilja i mučenja prije smrti. Pronađene lubanje imale su rane od metka, a uočeni su i tragovi bajuneta (14).

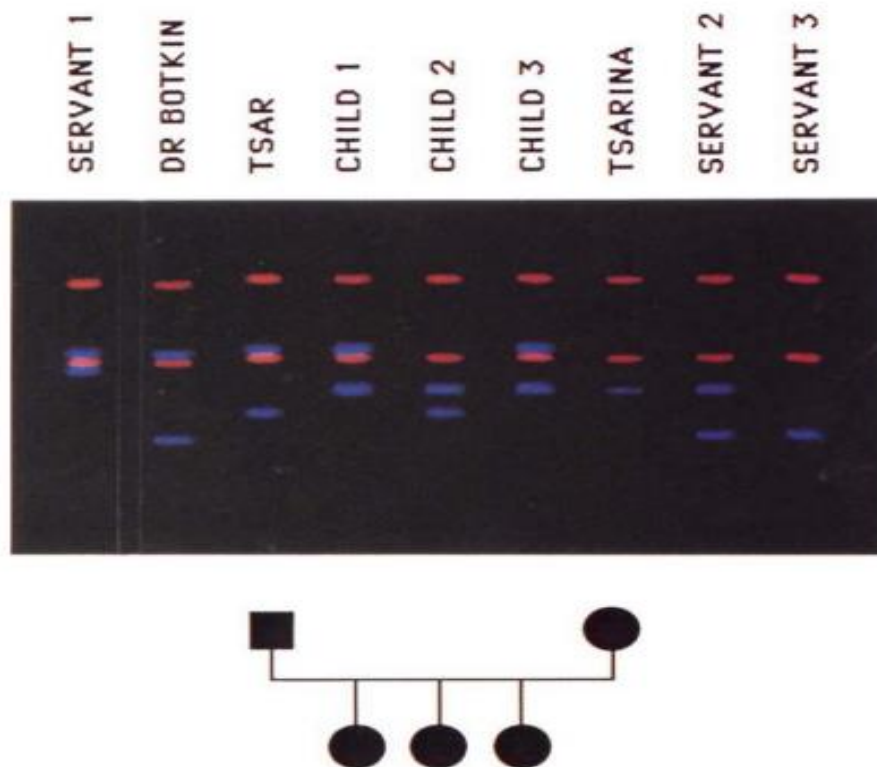
Klasična facijalna identifikacija lica bila je otežana zbog uništenog područja lica lubanje. Ruski forenzičari koristili su različite metode koji su uključivali računalno potpomognutu rekonstrukciju lica, odontologiju, te procjenu starosti i određivanje spola posmrtnih ostataka. Ono što je upućivalo na činjenicu da se radi o posmrtnim skeletnim ostacima aristokratske obitelji jeste činjenica da su neka od tijela imala zubne radove od zlata, platine i porculana. Ispitivanja ruskih znanstvenika pokazala su da se u jami nalaze ostatci cara, carice i troje od petero njihove djece. Zaključeno je da su nestala dva tijela, i to carevića Alekseja i jedne od kćeri (14).

1992.god. pokrenuta je službena englesko-ruska istraga kako bi se potvrdila autentičnost ostataka korištenjem tehnika temeljenih na DNA. Pristupilo se prvo analizi kromosomske DNA, testiranju spola, STR analizi s ciljem otkrivanja pripadanja svih članova jednoj te istoj obitelji, te analizi mt DNA kako bi se odredilo srodstvo s poznatim potomcima obitelji Romanov koji su u srodstvu po majčinoj nasljednoj liniji.

4.2.1.1. Testiranje spola

Spol skeletnih ostataka određen umnožavanjem dijela x-y homolognog gena, amelogenina, koji predstavlja najkorisniju metodu za tipiziranje uzoraka vrlo degradirane prirode kao što je ovdje slučaj. Ekstrakti DNA iz svih devet kostura tipizirani su rezultati potvrdili zaključke izvedene na osnovu fizičkog pregleda kostiju a koji se odnose na njihov spol. Ovom metodom identificirano je ukupno četiri muška i pet ženskih tijela (14).

Pet tetrametričkih STR lokusa amplificirano je iz svakog od devet kostura. Količina DNA dodane u svaku reakciju amplifikacije bila je između 20-40 pg što je odgovaralo 3-7 diploidnih kopija genoma. Kako bi se izbjegle pogreške u upisivanju, svi su uzorci analizirani najmanje četiri puta, a svaki koji su bili očiti homozigoti, najmanje šest puta. Svi uzorci skeleta dali su rezultate amplifikacije koji odgovaraju očekivanim veličinama alela. Tipični rezultati prikazani su na slici 8. Plave vrpce prikazuju amplificirane HUMTH01 alele, dok crvene vrpce prikazuju različite veličine markere korištene u elektroforezi (14).



Slika 8. Analiza skeletnih ostataka na STR lokusu HUMTH01 (izvor: Gill, P., Ivanov, P. L., Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N., Tully, G., ... & Sullivan, K. (1994). Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature genetics*, 6(2), 130-135.)

Ukoliko se zaista radi o posmrtnim ostacima obitelji Romanov onda rezultati STR analize i spolnog testiranja pokazuju da su jedna od princeza i carević Aleksej nestali iz groba. Ova činjenica bi potvrdila i neke povijesne izvještaje koji pokazuju da su dva tijela ili spaljena ili pokopana odvojeno, ili da su dvije osobe eventualno preživjele masakr (14).

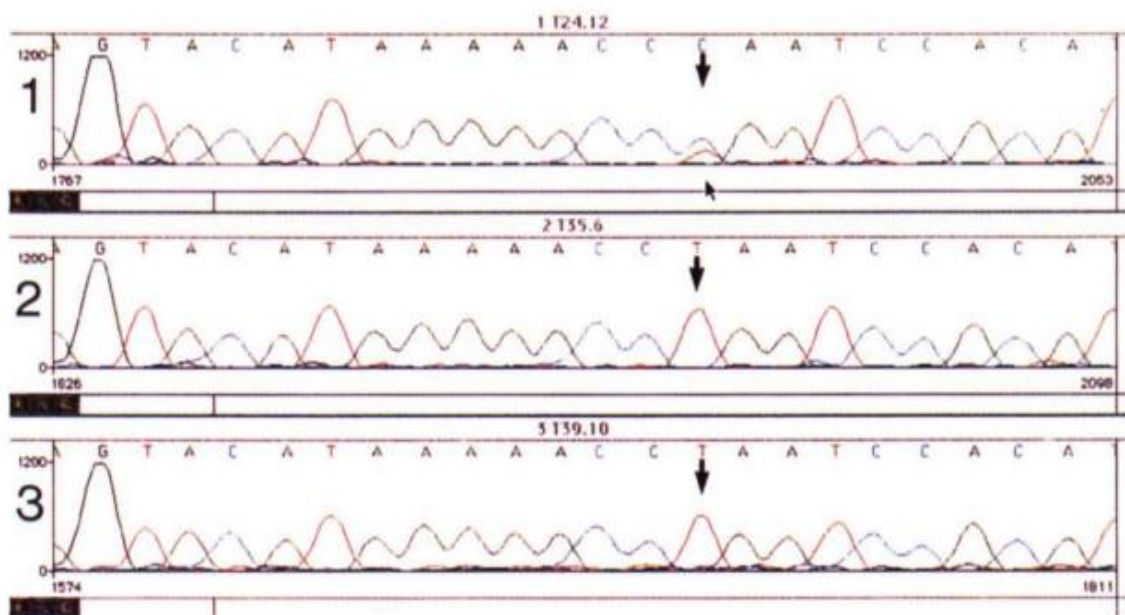
4.2.1.2. Analiza mtDNA

Na svim uzorcima sekvencionirane se obje hipervarijabilne regije mtDNA na oba lanca mtDNA. Iznimka je napravljena kod kostura 9 (vjerojatni sluga) za koji je slijed od nt 16246 do 16360 određen ručnim sekvencioniranjem iz samo jednog lanca. Nisu uočene razlike u sekvencama između duplih uzoraka iste osobe. Iz amplificiranih ekstrakata DNA kosti određeno je 380 nukleotida u prvoj hipervarijabilnoj regiji (baze 16020 do 16400) i 360 nukleotida u drugoj hipervarijabilnoj regiji (baze 48 do 408). Kvaliteta sekvence bila je usporediva s onom dobivenom

iz uzoraka francuske krvi. Usporedbe po parovima iz devet uzoraka kostiju pokazale su da je u pronađenoj skupini bilo prisutno šest različitih sekvenci koje su u prosjeku varirale za šest nukleotida, a identične sekvence su generirane od navodne carice i troje djece.

Nj. KV princ Philip, vojvoda od Edinburgha, pranećak neprekinutog majčinog podrijetla od carice Aleksandre dao je uzorak krvi u svrhu usporedbe što je omogućilo da se potvrdi status brata i sestre djece i identifikaciju majke. Sve mtDNA sekvence bile su iste.

Sekvenca mtDNA navodnog Cara uspoređena je s dva rođaka neprekinutog majčinog podrijetla od Careve bake po majci. Dva su rođaka imala isti slijed kao i osoba za koju se pretpostavlja da je bio Car, s izuzetkom jednog nukleotida (nt) na poziciji 16169. Detaljnijom analizom navedene sekvence uočena je pojava heteroplazme na ovoj poziciji (slika 9.) koja se sastoji od nt C i T u omjeru 3,4:1.



Slika 9. Usporedba sekvence mtDNA (nt 16155-16178) pretpostavljenog Cara (1) i dva njegova rođaka po majčinoj nasljednoj liniji (izvor: Gill, P., Ivanov, P. L., Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N., Tully, G., ... & Sullivan, K. (1994). Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature genetics*, 6(2), 130-135.)

MtDNA sekvence majke (Dagmar, kći Louise od Hesse Cassel i Christiana IX, od Danske) i bake (Louise od Hesse Cassel) cara Nikole II nisu dostupne, tako da nije poznato je li heteroplazma spomenute sekvence bila prisutna kod bilo koje žene.

4.2.2. Identifikacija posmrtnih ostataka kralja Richarda III

Ovaj slučaj je od posebnog interesa jer je najstariji slučaj identifikacije DNA poznate osobe do danas. Richard III jedan je od najpoznatijih i najkontroverznijih engleskih kraljeva. Njegov uspon na prijestolje 1483., nakon smrti njegova brata, Edwarda IV, je sporno. Diskreditacija legitimnosti Edwardsovog braka također je sporna a time i pravo oba Edwardsova sina na prijestolje. Smatra se da je Richard naredio da se ubiju njegova dva nećaka kako bi naslijedio prijestolje. Richard je izgubio život, u dobi od 32 godine, u bitci kod Boswortha 22. kolovoza 1485.g. Pretpostavlja se da je posljednje počivalište kralja Richarda III samostan Sivih fratara u Leicesteru. Na istom mjestu pronađen je i iskopan kostur u rujnu 2012.g. Arheološke, osteološke i radiokarbonske analize bile su u skladu s tim da se radi o skeletnim ostacima Richarda III. Pronađeni kostur je pripadao muškoj osobi starosti od 30 do 34 god. Uočena je teška skolioza zbog čega je jedno rame bilo više od drugog s brojnim perimortalnim borbenim ozljedama (15).

Najveća ozljeda je rupa na lubanji gdje je dio baze lubanje potpuno odrezan. Ovakvu ozljedu je mogla uzrokovati velika, vrlo oštra oštrica (slika 10.) (16).



Slika 10. Ozljeđe na lubanji (izvor: <https://le.ac.uk/richard-iii/identification/osteology/injuries/skull-4-6>)

Analiza DNA bila je jedan od niza dokaza koji je trebalo upotrijebiti za potvrdu identiteta Kostura 1 s nalazišta Greyfriars kao kostura kralja Richarda III. Ali analiza DNA iz ostataka bila bi besmislena bez poznatog živućeg srodnika (rođaka) s kojim bi se DNA usporedila. Richard III nije ostavio živućeg potomka pa je bilo potrebno genealoško istraživanje kako bi se pronašli odgovarajući rođaci koji bi se koristili za identifikaciju ostataka (17).

Nedostajali su genetski i genealoški podaci, te integrativna analiza genetskih i negenetskih dokaznih linija. Napravljena je drevna i moderna DNA analiza i sinteza svih dokaza zajedno s ciljem utvrđivanja identiteta pronađenog kostura. DNA je ekstrahirana iz uzoraka zuba i kosti (femura). Uključene su dvije slijepe probe za ekstrakciju i tretirane su točno kao da su ekstrakti tijekom cijelog procesa (15).

4.2.2.1. Određivanje spola posmrtnih ostataka

Spol skeletnih ostataka određen je amplifikacijom segmenata X- i Y- kromosoma. Korišten je novodizajnirani test tipizacije spola koji se sastoji iz PCR početnica za koamplifikaciju SRY fragmenta s UTX i UTY homolognim regijama. Ovaj test osmišljen je upravo za uzorke koji sadrže degradiranu DNA (15).

Rezultati su potvrdili da se radi o ostacima muške osobe. Fizičkim pregledom kostiju je također potvrđen ovaj rezultat.

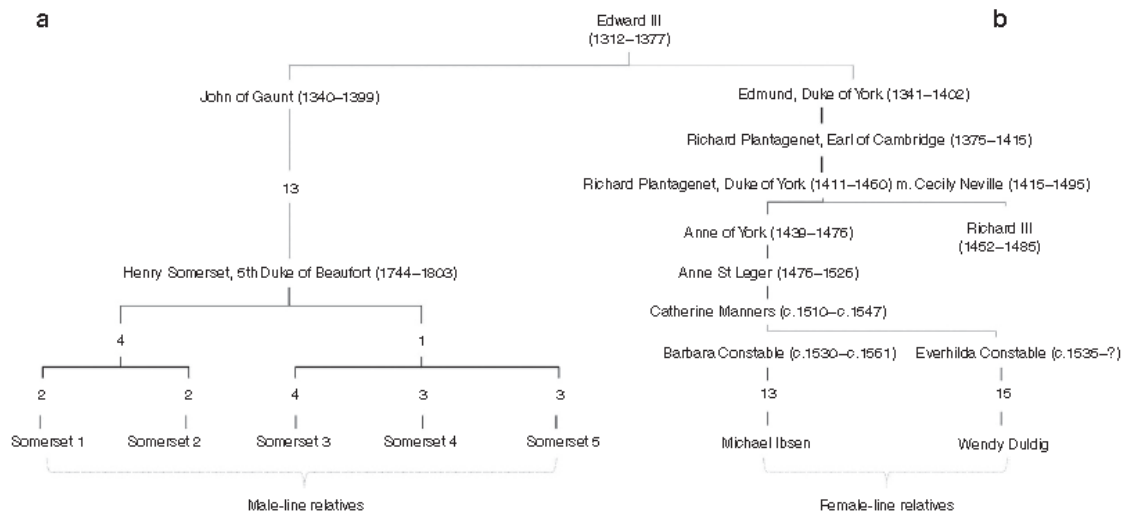
4.2.2.2. Srodstvo po muškoj liniji i analiza Y kromosoma

Budući da Richard III nije imao živućih potomaka, bilo je neophodno pronaći pojedince povezane s njim kroz druge genealoške veze (15).

Uspješno je identificirano, locirano i kontaktirano pet živućih rođaka, potomaka Vojvode od Beauforta (1744.-1803.). Pristali su sudjelovati u studiji i pružili tako skup rođaka po muškoj nasljednoj liniji (iako udaljen između 24 i 26 generacija). DNA je uzeta iz uzorka sline živućih rođaka Richarda III (15).

Genealoške informacije pokazale su da je svih pet živućih rođaka Richarda III po muškoj liniji potjecalo od Henry-a Somerseta, 5. vojvode od Beauforta, a podatci o Y kromosomu za četiri od pet rođaka po muškoj liniji pokazali su podudaranje u skladu s očekivanim srodstvom. Međutim, jedan od petorice imao je sasvim drugačiji tip Y kromosoma što ukazuje da se lažno očinstvo dogodilo u posljednjih nekoliko generacija. Tip kromosoma Y Kostura 1 nije odgovarao nijednom od živućih rođaka po muškoj liniji, što pokazuje da se događaj (ili događaji) lažnog očinstva također dogodio negdje u 19 generacija između Richarda III. i Henry-a Somerseta, 5. vojvode od Beauforta. Ovo nije bio osobito iznenađujući rezultat budući da su povijesne stope lažnog očinstva oko 1-2% po generaciji (18).

Živuci rođaci i Richard III povezani su preko muškog rođaka Edwarda III četiri generacije dalje od Richarda III. (slika 11.) (15).



Slika 11. Genealoške veze između Richarda III i živućih rođaka (izvor: King, T. E., Fortes, G. G., Balaresque, P., Thomas, M. G., Balding, D., Delser, P. M., ... & Schürer, K. (2014). Identification of the remains of King Richard III. *Nature communications*, 5(1), 5631.)

Genealoške informacije povezuju Somersete s Richardom III, po potpuno muškoj liniji preko Edwarda III. Poznato je da su se dva izvanbračna događaja u kojima su sinovi rođeni izvan braka dogodila u razdoblju između Johna od Guanta i Henrya Someseta, 5. vojvode od Beauforta (15).

Uočeno je da četiri živuća rođaka pripadaju haplokupini R1b-U152 (x L2, Z36, Z56, M160, M126 i Z192) sa STR haplotipovima koji su u skladu s njima i čine jednu patrilinearnu skupinu. Utvrđeno je da jedna osoba (Somerset 3) pripada haplogrupi I-M170 (x M253, M223) i stoga ne može biti patrilinearni rođak druge četiri unutar razmatranog vremenskog raspona, što ukazuje da se događaj lažnog očinstva dogodio unutar posljednje četiri generacije (15).

Za razliku od Y-haplotipova navodnih modernih rođaka, Kostur 1 pripada haplokupini G-P287, s odgovarajućim Y-STR haplotipom.

Sekvenciranje jednonukleotidnih polimorfizama (SNP-ova) Y-kromosoma na kosturu 1 provedeno je hibridizacijskim snimanjem DNA na nizu od 24 amplificirane Illumina biblioteke sekvenciranja, korištenjem sonde generiranih za pokrivanje SNP-ova relevantnih za glavne europske Y loze, nakon čega je uslijedilo sekvenciranje na 100 SE Illumina Hiseq 2000. Ovaj pristup nije pružio dovoljnu pokrivenost za neke SNP-ove i daljnje tipiziranje provedeno je

korištenjem ciljanih PCR-ova s produktima amplifikacije sekvenciranim na Ion Torrent PGM. Također je generiran STR haplotip koristeći Promega PowerPlex Y23 sustav (15).

4.2.2.3. Utvrđivanje srodstva po ženskoj liniji i analiza mtDNA

Uzorci su uzeti od živućih rođaka Michaela Ibsena (ML1) i od Wendy Duldig (ML2). Wendy Duldig i Michael Ibsen rođaci su 14. ženske linije (slika 12.).

Analize mtDNA provedena je u dvije faze. U prvoj fazi, oba lanca kontrolne regije mtDNA (1210 bp) sekvencirana su u duplikatu iz ML1 i ML2 pomoću Sangerovog sekvenciranja.

Nisu uočene razlike u sekvencama između dupliciranih uzoraka iste osobe ili pojedinaca. Tri hipervarijabilne regije (HV1, HV2, HV3) mtDNA kontrolne regije Kostura 1 sekvencirane su iz dvije neovisne ekstrakcije provedene u dva različita drevna DNA laboratorija. Također je provedeno Sangerovo sekvenciranje kloniranih PCR produkata i nisu primijećene razlike u sekvencama osim za dvije koje se mogu pripisati uzorcima oštećenja DNA pronađenim u drevnoj DNA. Pronađeno je savršeno podudaranje između sve tri osobe (ML1, ML2 i Kostur 1), što ukazuje na činjenicu da su sve tri osobe rođaci po majčinoj nasljednoj liniji.

Kako bi se utvrdila potpuna sličnost mtDNA, provedeno je kompletno sekvenciranje mitohondrijskog genoma na sva tri uzorka. Za uzorke živućih rođaka (ML1 i ML2), cijeli mitohondrijski genom je amplificiran putem dva PCR-a dugog dometa u duplikatu, nakon čega je uslijedilo sekvenciranje na Ion Torrent PGM. Sva mjesta koja se razlikuju od revidirane Cambridge referentne sekvence (rCRS) naknadno su potvrđena Sangerovim sekvenciranjem na obje niti u ML1 i ML2 u duplikatu. Sekvencioniranje cijelog genoma sekvence mtDNA Kostura 1 provedeno je korištenjem on-array DNA hibridizacijskog snimanja na 24 biblioteke sekvenciranja generirane iz 16 ekstrakata korištenjem sonde generiranih iz sekvence mtDNA dva živuća srodnika nakon čega je uslijedilo sekvenciranje na jednom 100 SE Illumina Hiseq 2000 staza za sekvenciranje (15).

Oni su otkrili savršeno podudaranje sekvence cijelog genoma s ML1 i jednu razliku (pozicija 8,994) s ML2 u skladu s tim da su te osobe bile matrilinearni rođaci.

Zatim je istražena vjerojatnost da je do podudaranja mtDNA između Kostura 1 i ML1 moglo doći slučajno. Nisu pronađene podudarnosti s promatranom sekvencom u bazi podataka od 26127

europskih cjelovitih sekvenci kontrolne regije mtDNA niti u bazi podataka od 1832 uzorka s Britanskih otoka koji pokrivaju samo pozicije 16 093–16 320 i 00073–00188, čime se sugerira da je haplotip rijedak. Korištena je manja britanska baza podataka niže razlučivosti kako bi se dobila vrlo konzervativna vrijednost vjerojatnosti podudaranja od 2/1832 (15).



Slika 12. Nasljeđivanje po majčinoj nasljednoj liniji (Izvor: <https://le.ac.uk/richard-iii/identification/genetics/female-line-family-tree>)

4.2.2.4. Određivanje vjerojatnosti boje kose i očiju Richarda III

Tipizacija DNA boje očiju i kose provedena je korištenjem sonde dizajniranih za HirisPlex31 SNP-ove. Poslije se pristupilo PCR-u pomoću novodizajniranih početnica za generiranje amplikona dužine ispod 100 bp. Sekvenciranje je napravljeno na PGM-u Ion Torrent. Predviđanja fenotipa proizvedena su iz statističkih modela IrisPlex i Hirisplex3134. Ovi rezultati pokazuju da je kostur 1 imao 96% vjerojatnosti da će imati plave oči zajedno sa 77% vjerojatnosti da će imati plavu kosu (slika 13.) (15).



Slika 13. Portret Richarda III (izvor: King, T. E., Fortes, G. G., Balaesque, P., Thomas, M. G., Balding, D., Delser, P. M., ... & Schürer, K. (2014). Identification of the remains of King Richard III. *Nature communications*, 5(1), 5631.)

4.2.2.5. Statistička analiza

Napravljena je kompletna negenetska analiza podataka kao što su: radiokarbonski podatci, procijenjena dob u trenutku smrti, spol, prisutnost skolioze te prisutnost perimortalnih ozljeda. Ujedno s negenetskom analizom, provedena je i genetska analiza podataka koja se odnose na analizu mtDNA i Y kromosoma. Za svaku vrstu podataka napravljena je analiza vjerojatnosti prema hipotezama: Hipoteza 1: Pronađeni kostur je Richard III i Hipoteza 2: Pronađeni kostur nije Richard III. Zajednička vjerojatnost svih dokaza dobivena je množenjem pojedinačnih vjerojatnosti pod svakom hipotezom. Ukoliko se zanemari dokaz o Y kromosomu, zbog njegove osjetljivosti na pojavu lažnog očinstva i ukoliko se uzme u obzir da dokazi o mtDNA idu u prilog prvoj hipotezi, može se reći da su genetski dokazi ujedno s negenetskim dokazima izuzetno jaki i podržavaju prvu hipotezu. LR ukazuje na vjerojatnost da je prva hipoteza istinita između 0,9999994 i 0,9999999 (15).

Analizom svih spomenutih podataka, zaključeno je da su dokazi izuzetno jaki i da pronađeni kostur na nalazištu Grey Friars u Leicesteru pripada Richardu III.

4.2.3. Identificiranje pojedinaca sekvenciranjem mtDNA iz zuba

Zubi predstavljaju izvrstan izvor DNA u svrhu identifikacije. Najbogatiji izvor DNA jesu pulpa, dentin i cement (19). DNA u zubu je smještena u mekoj pulpi bogatoj stanicama u unutrašnjosti zuba. S vanjske strane zubnu pulpu okružuje caklina koja je posebno otporna na degradaciju okoliša i samim time DNA ostaje zaštićena kroz dugo vremensko razdoblje (20).

Zdravi zubi s najvećim volumenom pulpe su najbolji izvor DNA. Zubi s više korijena imaju najveći volumen pulpe (više stanica pulpe) i veću površinu korijena. INTERPOL-ovi protokoli za Disaster Victim Identification (DVI) Guide 2009 i Komisija za DNA Međunarodnog društva forenzičke genetike (ISFG) preferiraju kutnjake kao izvor uzorka za ekstrakciju DNA (19).

U ovom radu ispitani su i analizirani zubi 11 osoba koji nisu međusobno rodbinski povezani. Cilj je bio usporediti sekvence mtDNA iz zubi pohranjenih dugi niz godina i mtDNA iz svježeg uzorka (krvi ili bukalne sluznice).

5 ispitanika koji nisu rodbinski povezani, za analizu su donirali ekstrahirane mliječne zube i zube umnjake koje su sačuvali u zatvorenom tijekom određenog vremenskog razdoblja (20).

Iste osobe i/ili njihovi srodnici po majci dali su uzorke krvi te briseve bukalnih epitelnih stanica kako bi se ekstrahirala mtDNA. Za navedene ispitanike poznato je da imaju vrlo slične sekvence mtDNA. Pored toga, analizirani su i zubi pet nepoznatih osoba koje su dostavili lokalni stomatolozi. Spomenuti uzorci zubi bili su dugo pohranjeni u 3% vodikovom peroksidu. Sekvenciranje je napravljeno bez poznavanja izvora zuba i svježe DNA (20).

Jedanaesti uzorak odnosio se na dva mliječna zuba iz djelomično skeletiziranih ostataka žrtve ubojstva pronađenih u plitkom grobu u saveznoj državi New York, u siječnju 1992.godine. Forenzično ispitivanje kostura i odjeće pronađenih u grobnici sugeriralo je da se pronađeni ostaci odnose na nestalog 14-godišnjeg Afroamerikanca koji je nestao u ožujku 1991.godine. Uspoređene su sekvence mtDNA iz uzorka zuba s uzorkom krvi od majke koje je prijavila nestanak djeteta (20).

4.2.3.1. Sekvenciranje mtDNA

Prije sekvenciranja mtDNA, zubi su očišćeni, djelomično izbušeni i slomljeni kako bi se došlo do zubne pulpe. Zatim je slijedila inkubacija slomljenog uzorka zuba u SDS, EDTA i proteinazi K. Iza toga, DNA je pročišćena upotrebom fenola: ekstrakcije kloroforma i butanola te isprana filtracijom. Iz svakog zuba dobiveno je otprilike 50 ng pročišćene DNA (20).

Za pripremu mtDNA za sekvenciranje korišten je postupak u dva koraka. Prvo, korištene su početnice L15926 i H580 za proizvodnju dvolančane DNA iz kontrolne regije od 1,2kb. Zatim je pročišćena kontrolna regija mtDNA korištena kao predložak za asimetrične PCR amplifikacije varijabilne regije 1, koristeći početnice L15996 i H16498, ili varijabilne regije 2, koristeći početnice L29 i H408. Ove regije su potom izravno sekvencionirane. Određeno je 350 nukleotida u regiji 1 (baze 16050-16400) i 300 nukleotida u regiji 2 (baze 70-370). Osim umnožavanja mtDNA bilo je moguće umnožiti i nuklearni fragment Mfd 188 (D175S579) iz DNA ekstrakta zuba (20).

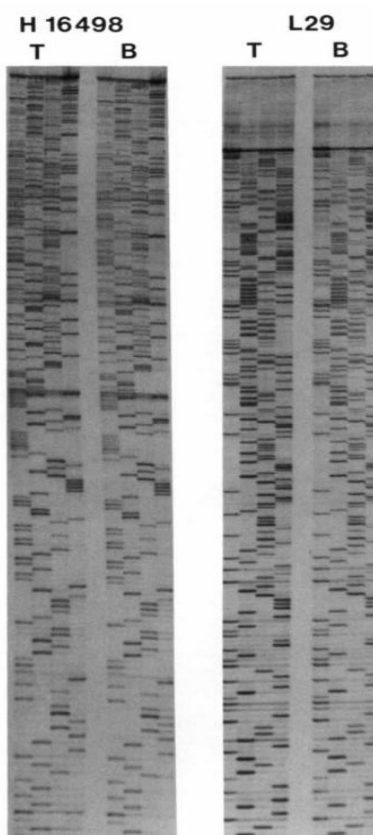
4.2.3.2. Usporedba s poznatim sekvencama mtDNA

Sekvence dijelova kontrolne regije mtDNA koje su određene asimetričnim PCR-om te izravnim sekvenciranjem objavljene su za najmanje 524 osobe, od kojih su mnogi Afrikanci. Također, određene su i sekvence mtDNA varijabilnih regija 1 i 2 za 126 Afroamerikanaca koji žive u New

Yorku i za 215 bijelaca. Sekvence mtDNA dobivene iz zubi uspoređene su s ovih 865 sekvenci (20).

U svakom slučaju, sekvenca mtDNA iz zubi odgovarala je sekvencama mtDNA iz krvnih ili bukalnih stanica ispitanika i/ili njihovih srodnika po majci.

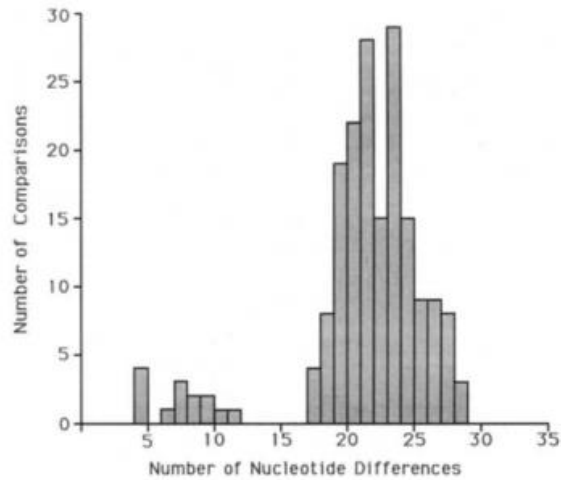
Na slici 15. prikazana je sekvenca mtDNA iz zuba žrtve ubojstva i sekvenca mtDNA iz krvi žene čiji je sin nestao. Sekvence zuba i krvi bile su identične za svih 639 ispitanih nukleotida (20).



Slika 15. Prikaz sekvenci mtDNA kontrolnih regija 1 (prajmer H16498) i 2 (prajmer L29) iz zuba skeletnih ostataka žrtve (T) i krvi (B) vjerojatne majke žrtve (izvor: Ginther, C., Issel-Tarver, L., & King, M. C. (1992). Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nature genetics*, 2(2), 135-138.)

Ova sekvenca je uspoređena sa sekvencama 184 Afroamerikanaca i Afrikanaca (slika 16.). Sekvenca zuba razlikovala se od svake druge sekvence za najmanje 4 nukleotida; srednji broj razlika bio je 21. Broj razlika bio je bimodalan, što ukazuje na činjenicu da sekvencirana mtDNA

Afrikanaca i Afroamerikanaca do danas spada u najmanje dvije populacije u odnosu na sekvencu žrtve ubojstva Afroamerikanca. Vjerojatnost da su sekvence iz zuba i krvi bile od rođaka po majci veće su od 0,996 (20).



Slika 16. Razlike u broju nukleotida između sekvence mtDNA i sekvence 184 Afrikanca i Afroamerikanca (izvor: Ginther, C., Issel-Tarver, L., & King, M. C. (1992). Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nature genetics*, 2(2), 135-138.)

5. RASPRAVA

Analiza mitohondrijske DNA je još snažnija u odnosu na ostale vrste DNA jer je veća mogućnost opstanka u starim skeletnim ostatcima u odnosu na nuklearnu DNA. mtDNA sadrži visoko polimorfne regije koje su izuzetno važne za razlikovanje nasljednih majčinih linija.

Za utvrđivanje srodstva s poznatim potomcima koji su u srodstvu preko majčine nasljedne linije, analiza mtDNA se pokazala korisnom, kao što je slučaj prikazan kod obitelji Romanov.

Mogućnost pojave heteroplazme može predstavljati poseban problem i takva pojava opisana je u slučaju kod usporedbe sekvence mtDNA navodnog cara Nikole II s dva živa srodnika po majčinoj nasljednoj liniji. Sekvenca mtDNA navodnog cara Nikole II pokazala je razliku u jednom nukleotidu. Ukoliko sekvence mtDNA majke nisu dostupne, ne može biti poznato ni je li koja žena pokazala pojavu heteroplazme ispitanе sekvence.

Za tumačenje dokaza i rezultata potrebno je razmatrati i znanstvene i neznanstvene dokaze, kao što su antropološki, stomatološki, osteološki, genealoški te podaci datiranja radiokarbonom. Sinteza svih spomenutih dokaza i podataka zajedno s genetičkim podacima (kao što je analiza mtDNA) mogu dati jasniju sliku pri identifikaciji relativno starih skeletnih ostataka.

Kako bi se utvrdila potpuna sličnost mtDNA, neophodno je provesti kompletno sekvenciranje mitohondrijskog genoma na svim ispitivanim uzorcima. U nekim slučajevima neophodno je i istražiti eventualno slučajno podudaranje mtDNA između ispitivanih uzoraka. U ovu svrhu mogu poslužiti baze podataka kompletnih sekvenci kontrolne regije mtDNA.

Za analizu mtDNA, preporučuje se ekstrahirati uzorke iz zuba i kosti (femura). S ciljem otklanjanja kontaminacije DNA starih skeletnih ostataka, potrebno je voditi računa o sljedećem: iskopavati uzorke u čistim uvjetima; uzorke pohraniti u čistim laboratorijima; odvojene uzorke obraditi u odvojenim laboratorijima kako bi se ponovili rezultati.

Destrukcija i razgradnja mekih tkiva mogu ostaviti samo zube i kosti dostupnima za analizu. mtDNA iz zuba odlikuje najveći stupanj čistoće budući da je smještena u zubnoj pulpi koja je zaštićena caklinom i štiti mtDNA od biološke razgradnje. Ekstrahirana mtDNA iz zuba bitna je za produljenje vremena u kojem se raspadnuti ostatci mogu identificirati. Da bi se izbjegla eventualna

egzogeno kontaminacija DNA potrebno je upotrijebiti odgovarajuće tehnike čišćenja površine zuba.

6. ZAKLJUČCI

1. Identifikacija ljudskih ostataka pomoću analize mtDNA predstavlja koristan alat u forenzičnim istragama, budući je prisutna u velikom broju u stanicama.
2. mtDNA se može koristiti za praćenje nasljeđivanja po majčinoj nasljednoj liniji i kao takva mtDNA je jedina opcija za utvrđivanje srodstva ukoliko postoji nekoliko generacija između pretka i živog srodnika.
3. Usporedbom sekvenci mtDNA sa poznatim srođnicima po majci, moguće je identificirati povezanost članova jedne te iste obitelji.
4. Posebno ograničenje kod identifikacije konkretne osobe može predstavljati pojava heteroplazme.
5. Izvrstan izvor mtDNA visokomolekularne težine jesu zubi te genetska identifikacija ostataka primjenom analize mtDNA iz zuba može biti korisna u mnogim forenzičnim slučajevima, kao što su ubojstva u kojima žrtva nije pronađena.

7. LITERATURA:

1. Medineplus.gov
2. Primorac, D., Marjanović, D., Lauc, G., Ćurić, G., Gornik, I., Anđelinović, Š., ... & Asplen, C. (2008). *Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu*. Medicinska naklada.
3. Christensen, Angi M., Nicholas V. Passalacqua, and Eric J. Bartelink. *Forensic anthropology: current methods and practice*. Academic Press, 2019.)
4. Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States, D.R. Hares, *Forensic Sci. Int. Genetics* 17:33-34 (2015)
5. Byard, R., & Payne-James, J. (2015). *Encyclopedia of forensic and legal medicine*. Academic Press.
6. Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2010). *Stanica: molekularni pristup*. Medicinska naklada.
7. Amorim, A., Fernandes, T., & Taveira, N. (2019). Mitochondrial DNA in human identification: a review. *PeerJ*, 7, e7314.
8. Melton, T., & Nelson, K. (2001). Forensic mitochondrial DNA analysis: two years of commercial casework experience in the United States. *Croatian medical journal*, 42(3), 298-303.
9. Antolin, M. F., Black, W. C., & Levin, S. A. (2001). Genes, description of. *Encyclopedia of Biodiversity*, 3, 654-661.
10. Sturk-Andreaggi, K. (2022). *Mitochondrial Genome Analysis Using Next Generation Sequencing for Forensic Applications* (Doctoral dissertation, Acta Universitatis Upsaliensis).
11. Bonatelli, I. A. S., Zappi, D. C., Taylor, N. P., & Moraes, E. M. (2013). Usefulness of cpDNA markers for phylogenetic and phylogeographic analyses of closely-related cactus species. *Genetics and Molecular Research*, 12(4), 4579-4585.
12. Budowle, B., Allard, M. W., Wilson, M. R., & Chakraborty, R. (2003). Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. *Annual review of genomics and human genetics*, 4(1), 119-141.

13. Holland, M. M., & Parsons, T. J. (1999). Mitochondrial DNA Sequence Analysis-Validation and Use for Forensic Casework. *Forensic science review*, 11(1), 21-50.
14. Gill, P., Ivanov, P. L., Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N., Tully, G., ... & Sullivan, K. (1994). Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature genetics*, 6(2), 130-135.
15. King, T. E., Fortes, G. G., Balaesque, P., Thomas, M. G., Balding, D., Delsler, P. M., ... & Schürer, K. (2014). Identification of the remains of King Richard III. *Nature communications*, 5(1), 5631.
16. <https://le.ac.uk/richard-iii/identification/osteology/injuries/skull-4-6>)
17. <https://le.ac.uk/richard-iii>
18. <https://le.ac.uk/richard-iii/identification/genetics/dna-analysis>
19. Mânica, S., Syed, F. M. S., Shoro, S., Venkatesh, A., & Qaq, R. (2019). What are the most important teeth in the field of Forensic Odontology?. *Bulletin of the International association for paleodontology*, 13(2), 41-47.
20. Ginther, C., Issel-Tarver, L., & King, M. C. (1992). Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nature genetics*, 2(2), 135-138.

8. SAŽETAK

Primjena analize mitohondrijske DNA u forenzičnim znanostima i njen značaj za rješavanje slučajeva

Cilj rada: Prikazati važnost i primjenu mtDNA u forenzičnim znanostima, posebno kod identifikacije ljudi kroz prikaz tri različita slučaja, te prednosti i moguća ograničenja njene primjene.

Metode: Primjenom deskriptivne metode opisana su tri različita slučaja primjene mtDNA u forenzičnim znanostima kod identifikacije ljudi. Prikazani su slučajevi izolacije mtDNA iz skeletnih ostataka različite starosti, kao i izolacija mtDNA iz zuba. Metodom usporedbe i analize dostupnih podataka navedene su prednosti i moguća ograničenja primjene mtDNA.

Rezultati: Tipizacija mtDNA postala je rutina u forenzičnoj biologiji i koristi se za analizu starih kostiju, zubi, dlaka i drugih bioloških uzoraka u kojima je sadržaj nuklearne DNA nizak. Usporedbom sekvenci mtDNA s poznatim srodnicima po majci, moguće je identificirati povezanost članova jedne te iste obitelji.

Zaključak: mtDNA je snažan i koristan forenzični alat kod identifikacije ljudskih ostataka, a posebno kod utvrđivanja srodstva. Posebno ograničenje kod primjene mtDNA kod identifikacije ljudi može predstavljati pojava heteroplazme.

Ključne riječi: mtDNA, identifikacija ljudi, heteroplazma, matrilinearno nasljeđivanje

ABSTRACT

Application of mitochondrial DNA analysis in forensic science and its significance for casework

Aims: To show the importance and application of mtDNA in forensic sciences, especially in the identification of people through the presentation of three different cases, as well as the advantages and possible limitations of its application.

Methods: Using the descriptive method, three different cases of mtDNA application in forensic science for human identification were described. Cases of isolation of mtDNA from skeletal remains of different ages are presented, as well as isolation of mtDNA from teeth. Using the method of comparison and analysis of available data, the advantages and possible limitations of mtDNA application are listed.

Results: mtDNA typing has become routine in forensic biology and is used to analyze old bones, teeth, hair and other biological samples in which the nuclear DNA content is low. By comparing mtDNA sequences with known maternal relatives, it is possible to identify the relatedness of members of the same family.

Conclusion: mtDNA is a powerful and useful forensic tool for identifying human remains, and especially for determining kinship. A special limitation in the application of mtDNA in the identification of people can be the occurrence of heteroplasmy.

Key words: mtDNA, human identification, heteroplasmy, matrilineal inheritance

9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Anita Šimić-Perutović

Datum i mjesto rođenja: 01. 06. 1985. godine, Zenica, Bosna i Hercegovina

Email: anitasimic106@gmail.com

Obrazovanje:

- 2019.-2023. Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti, Diplomski studij Forenzike, modul Forenzična kemija i molekularna biologija
- 2003.-2010. Univerzitet u Sarajevu, Prirodno-matematički fakultet, Odsjek za biologiju
- 1999.-2003. Opća gimnazija „Muhsin Rizvić“ Kakanj
- 1991.-1999. Osnovna škola „Hamdija Kreševljaković“ Kakanj

10. IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Sveučilišni odjel za forenzične znanosti

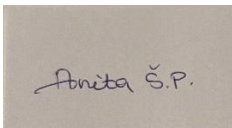
Izjava o akademskoj čestitosti

Ja, Anita Šimić Perutović, izjavljujem da je moj diplomski rad pod naslovom „Primjena mtDNA u forenzičnim znanostima“ rezultat mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Nijedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan bez citiranja i ne krši ičija autorska prava.

Izjavljujem da nijedan dio ovoga rada nije iskorišten u ijednom drugom radu pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj, obrazovnoj ili inoj ustanovi.

Sadržaj mojega rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Split, 01.09.2023. g.

Potpis studenta/studentice:  _____

