

Primjena novih tehnologija u forenzičnoj genetici

Zečić, Antonia

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:227:005002>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-28**

SVEUČILIŠTE
U
SPLITU



SVEUČILIŠNI
ODJEL ZA
FORENZIČNE
Znanosti

Repository / Repozitorij:

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



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

FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA

**DIPLOMSKI RAD
PRIMJENA NOVIH TEHNOLOGIJA U FORENZIČNOJ
GENETICI**

ANTONIA ZEČIĆ

Split, lipanj 2019.

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

FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA

**DIPLOMSKI RAD
PRIMJENA NOVIH TEHNOLOGIJA U FORENZIČNOJ
GENETICI**

MENTOR: PROF. DR. SC. DAMIR MARJANOVIĆ

KOMENTOR: JOSIP CRNJAC

ANTONIA ZEČIĆ

354/2016.

Split, lipanj 2019.

Rad je izrađen u Laboratoriju za forenzičnu genetiku i biologiju
pod nadzorom mentora prof. dr. sc. Damira Marjanovića i komentora Josipa Crnjca
u vremenskom razdoblju od 4. veljače 2019. do 6. lipnja 2019.

Datum predaje diplomskog rada: 6. lipnja 2019.

Datum prihvaćanja rada: 10. lipnja 2019.

Datum usmenog polaganja: 18. lipnja 2019.

Povjerenstvo: 1. Izv. prof. dr. sc. Marijana Bartulović

2. Dr. sc. Snježana Štambuk

3. Prof. dr. sc. Josip Kasum

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Povijest istraživanja DNA	1
1.2. Osnove forenzične DNA analize	1
1.2.1. Genetički biljezi	2
1.2.2. Spolni kromosomi i mitohondrijska DNA	4
1.2.3. Osnovne faze procesa DNA analize.....	5
2. MASIVNO PARALELNO SEKVENCIRANJE - MPS	9
2.1. Short-read	9
2.1.1. Roche 454	10
2.1.2. Illumina platforme	11
2.1.3. Applied Biosystems SOLiD sustav	12
2.1.4. Ion Torrent	13
2.2. Long-read.....	14
2.2.1. PacBio	15
2.2.2. MinION.....	16
2.3. Primjena masivnog paralelnog sekvenciranja u forenzici	16
2.3.1. Analiza STR biljega primjenom MPS platforme	17
2.3.2. Analiza SNP biljega primjenom MPS platforme.....	19
2.3.3. Analiza mtDNA primjenom MPS platforme	21
2.3.4. Analiza Y kromosoma primjenom MPS-a.....	23
2.3.5. Analiza mikrobioma primjenom MPS-a.....	24
2.3.6. Primjena MPS-a u određivanju fenotipskih karakteristika	26
2.3.7. Ostale primjene MPS-a u forenzici.....	27
2.3.8. Potencijalni problemi primjene MPS-a u forenzici.....	28
3. RAPID DNA TEHNOLOGIJA U FORENZIČNIM ZNANOSTIMA	31
3.1. Primjena rapid DNA tehnologije	31
3.2. Sustavi za rapid DNA analizu	33
3.2.1. ANDE™ sustav.....	33
3.2.2. Razvoj rapid DNA tehnologije pri FBI-u	34
3.2.3. RapidHit® ID sustav.....	35
4. ZAKLJUČAK	37
5. LITERATURA	39
6. SAŽETCI	44
6.1. Sažetak.....	44

6.2. Abstract.....	45
7. ŽIVOTOPIS	46
8. IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI	47

1. UVOD

1.1. Povijest istraživanja DNA

Analiza deoksiribonukleinske kiseline (engl. *Deoxyribonucleic acid* - DNA) neosporno ima ključnu ulogu u forenzičnim znanostima. Počevši još od 1865. kada je Gregor Mendel postavio osnovne principe nasljeđivanja svojim istraživanjima na vrtnom grašku i tako postavio temelje genetike, ova znanost neprestano napreduje povlačeći za sobom i ostale srodne znanosti, među kojima i forenziku. Još je nekoliko ključnih povijesnih trenutaka u istraživanju DNA bitno spomenuti. 1944. Oswald Avery i suradnici pokazuju da su geni građeni od osnovnog nasljednog materijala – deoksiribonukleinske kiseline. Već 1953. Watson i Crick prikazuju strukturu DNA molekule, a tri godine poslije postaje jasno kako je cjelokupni humani genski materijal raspoređen u 46 kromosoma tj. u 23 para homolognih kromosoma. Zatim, David Botstein i suradnici 1980. dokazuju postojanje malih varijacija u genskom materijalu koje se razlikuju od osobe do osobe. Ipak, ključni trenutak za razvoj forenzične analize DNA događa se 1985. kada Alec Jeffreys i suradnici otkrivaju kako neki dijelovi DNA sadržavaju ponavljajuće sekvence koje se razlikuju od osobe do osobe, te upravo ovo otkriće dovodi do rješavanja prvog forenzičnog slučaja upotrebom DNA analize. Još jednu veliku prekretnicu u analizi DNA predstavlja i otkriće lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction* - PCR) 1983. godine, a neprocjenjiva saznanja o ljudskom genomu stižu otkrićem strukture ljudskog genoma 2001. godine (1).

1.2. Osnove forenzične DNA analize

Jezgrina DNA genetički je materijal koji nosi nasljednu poruku zapisanu u genima, aktivnim segmentima koji se nalaze na određenim lokusima lanaca DNA uzvojnice. Ukupna jezgrina DNA smještena je u kromosomima. Molekula DNA građena je u obliku dvostruke uzvojnice, čine je jedinice zvane nukleotidi koji su građeni od tri podjedinice; pet-ugljičnog šećera, fosfatne skupine i dušičnih baza adenin (A), gvanin (G), citozin (C) i timin (T). Unutar

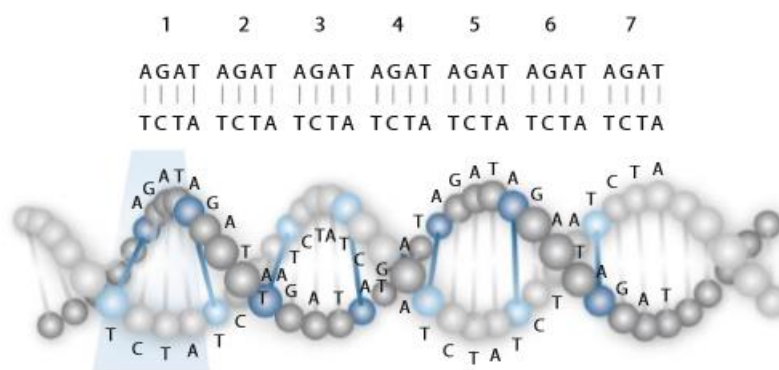
zavojnice između dva lanca dvostrukom vodikovom vezom vežu se adenin i timin, a trostrukom vodikovom vezom vežu se gvanin i citozin (2). Svaki na ovaj način spojeni par nukleotida naziva se par baza (pb), a u ljudskom genomu ima oko 3,2 milijarde parova baza. Promjene u bazama ili promjene u broju ponavljanja parova baza predstavljaju osnovu za identifikaciju osobe. Samo 0.5% DNA materijala je različito kod svakog čovjeka, ali taj je dio bogat polimorfizmima, tj. razlikama u genetskom materijalu među pojedincima. Upravo ova jedinstvena genetska građa svakog pojedinca temelj je identifikacije DNA analizom u forenzičnoj genetici (1).

1.2.1. Genetički biljezi

Forenzična genetika zasniva se na analizi tzv. genetičkih biljega. Termin genetički marker tj. biljeg koristi se u opisu dijela DNA čija su svojstva i lokus jasno određeni i na osnovi kojih se međusobno razlikuju živi sustavi. Naš genom sadrži velik broj biljega čija se polimorfnost zasniva na različitom broju ponavljanja poznatog repetitivnog motiva baza. U počecima forenzične genetike korišteni su biljezi promjenjivog broja uzastopnih ponavljanja (engl. *Variable Number Tandem Repeats* - VNTR). Većina ovih polimorfni biljega smještena je u nekodirajućem dijelu DNA, a njihova velika informativnost potječe od činjenice da broj alelnih varijanti na njima može biti i preko 100. Analiza ovih biljega bazirala se na metodi polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP). Nedostaci poput kompleksnosti, dugotrajnosti same analize, visoke cijene tog procesa te činjenice da su za analizu bile potrebne relativno velike količine dobro očuvane DNA, rezultirali su postupnim izbacivanjem ove analize iz rutinske primjene. Na mjesto VNTR biljega zatim su došli biljezi kratkih uzastopnih ponavljanja (engl. *Short Tandem Repeat* - STR) (3).

STR biljezi, nazvani i kratkim uzastopnim ponavljanjima, sastoje se od kratkih ponavljajućih sekvenci duljine 2-7 (2-10) baznih parova koji se na određenom lokusu ponavljaju određeni broj puta. Broj ponavljanja razlikuje se od osobe do osobe, čak i ako se na određenim lokusima osobe poklapaju po broju ponavljanja, mala je vjerojatnost da se poklapaju na svim CODIS (*Combined DNA Index System*) lokusima, kojih je u standardnim forenzičnim DNA analizama do 2017. godine bilo 13, a od 2017. godine sukladno novim preporukama sada je 20 lokusa. Velika vrijednost analize ovih biljega počiva na mogućnosti da se istovremeno

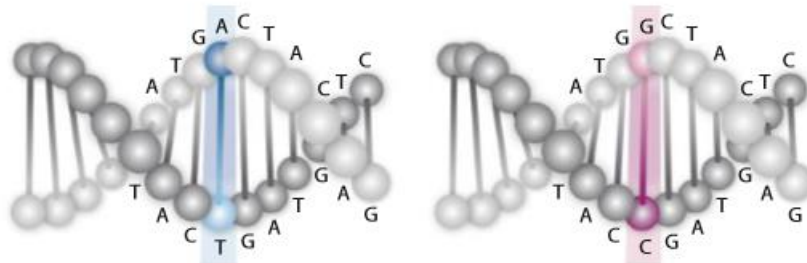
analizira veći broj STR lokusa koristeći multipleksne STR sustave, što omogućava visok stupanj individualizacije u identifikaciji tragova. Najčešće analizirani su tetranukleotidni STR lokusi, tj. oni čije ponavljajuće sekvence čine četiri baze (slika 1). Jasno su određeni tipovi i poželjne osobine STR lokusa, kao i njihova nomenklatura. Također, uvođenjem analize STR lokusa u rutinsku primjenu forenzičke DNA analize kreirane su baze podataka koje podrazumijevaju analizu seta točno određenih lokusa. Kreiranje baza podataka omogućilo je standardizaciju analize i usporedivost rezultata iz različitih dijelova svijeta (3).



Slika 1. Primjer heterozigota za STR i VNTR sa sedam ponavljanja na uzorku DNA (1)

Jedan od modernijih pristupa u forenzičnoj DNA analizi je upotreba tzv. SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) biljega. SNP polimorfizam zasniva se na zamjeni samo jedne baze u redu određene sekvence (slika 2). Činjenica da su ovi biljezi najrasprostranjenija vrsta DNA polimorfizama u ljudskom genomu te se pojavljuju svakih 1000 pb, čini ih jako informativnima (1). Ipak, manje su polimorfni i manje informativni od STR biljega. Također, svaki SNP se bazira na samo dvije alelne varijante, što ih čini nesigurnim u analizi miješanih tragova. Ipak, neke od prednosti su efikasnija analiza degradirane DNA, manji broj artefakata te mogućnost predikcije fenotipa analizom biološkog traga (3). Postoji više tehnologija koje se koriste u analizi SNP biljega. Zbog već spomenute činjenice da su SNP-ovi manje varijabilni nego STR-ovi te zbog ograničene količine DNA dostupne u forenzičnim analizama, jedna od najbitnijih karakteristika SNP testa je mogućnost simultane analize više biljega. Upravo zbog toga često su korištene tehnologije poput SNaPshot analize koja omogućava multipleksnu analizu deset ili više SNP biljega odjednom. U literaturi su opisani brojni SNP testovi za analizu mtDNA, Y-kromosoma i autosomnih biljega koji se koriste

upravo SNaPshot pristupom, a obavljaju se na instrumentima za kapilarnu elektroforezu dostupnima u većini forenzičnih DNA laboratorija (4).



Slika 2. Promjena jednog nukleotida u genetičkom kodu (1)

1.2.2. Spolni kromosomi i mitohondrijska DNA

Osim analize autosomnih biljega, u forenzičnoj DNA analizi posebno mjesto zauzimaju analiza spolnih kromosoma te analiza mitohondrijske DNA. Y-kromosom nasljeđuje se po muškoj liniji te, u odsustvu mutacija, identičan profil imaju sve muške osobe povezane s očevom lozom, stoga moguće podudaranja Y-STR profila dvaju tragova ne znače potpunu identifikaciju. Ipak, u forenzičnoj genetici njegova analiza korisna je u slučajevima silovanja ženskih osoba kada su prisutni miješani muški i ženski tragovi, nadalje kada se analiziraju miješani tragovi više od jednog muškarca, u dokazivanju očinstva muške djece, identifikaciji kada su prisutni srodnici samo s očeve strane te u utvrđivanju migracije naroda. Važnost analize Y-kromosoma u forenzičnoj genetici dokazuje i prisutnost velikog broja dostupnih komercijalnih multipleksnih sustava kojima je moguće analizirati i do 23 Y-STR lokusa. S druge strane, uporaba biljega X-kromosoma još nije prisutna kao rutinska metoda, ali znanstvenici se intenzivno bave problematikom X-kromosoma i rade na istraživanju novih X-STR biljega koji će biti podobni za forenzične DNA analize (1,5).

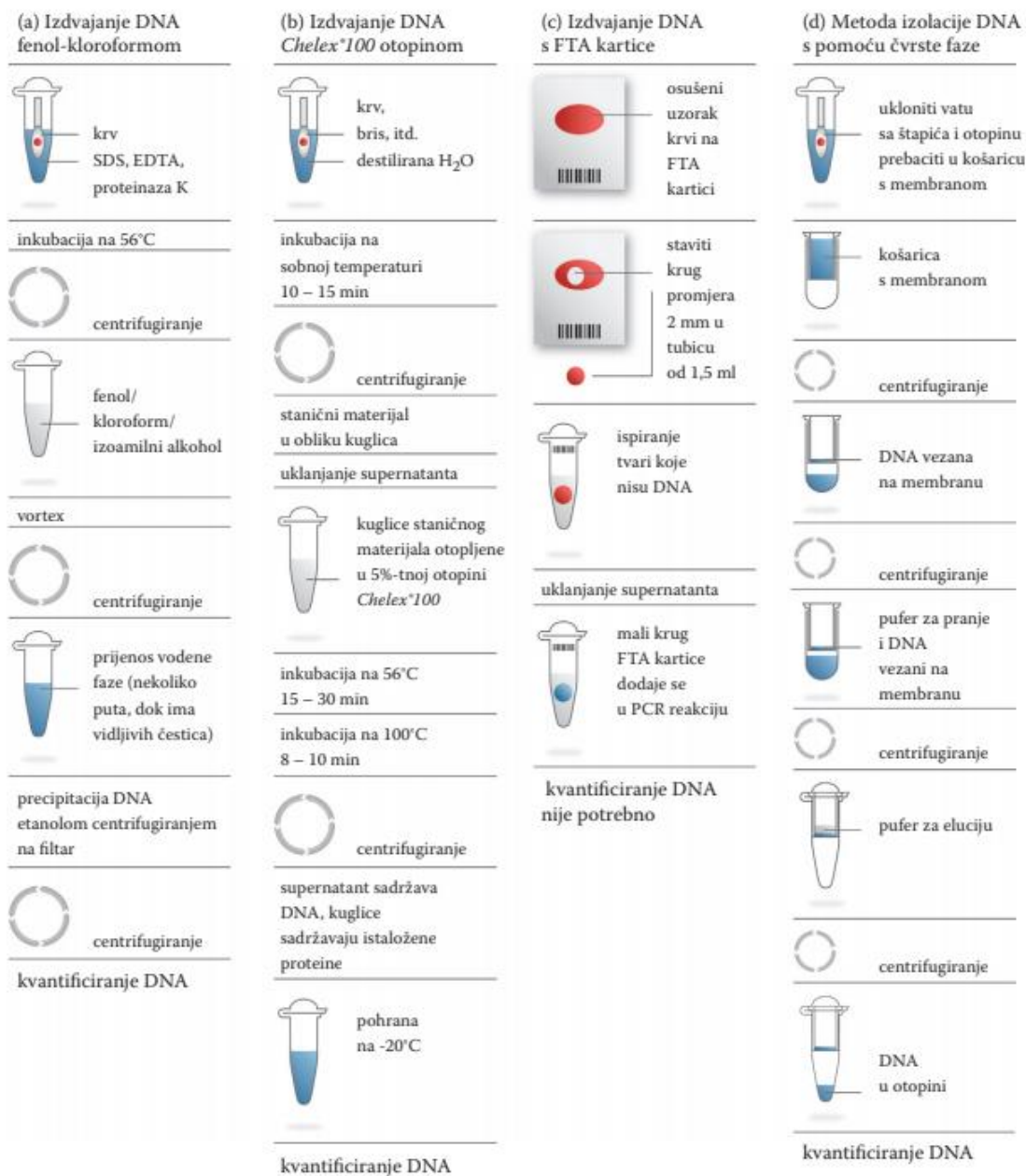
Analiza mitohondrijske DNA (mtDNA) vrijedan je alat u forenzičnoj DNA analizi. Poznato je kako je mitohondrijska DNA kružna molekula duga 16 569 parova baza koja ne sadržava introne. Njezine dvije hipervarijabilne regije HV1 i HV2 posebno su bitne u forenzičnoj DNA analizi. One su smještene u nekodirajućem dijelu mtDNA koji se zove kontrolna regija ili D-

petlja i za razliku od kodirajućeg dijela DNA ovi dijelovi jako su varijabilni unutar ljudskih populacija (3). Mitohondrijska DNA nasljeđuje se po majčinoj liniji te sva djeca imaju identičnu sekvencu mtDNA nukleotida kao i njihova majka. Još jedna bitna osobina mtDNA je izostanak rekombinacije (5). U forenzičnim slučajevima mitohondrijska DNA koristi se uglavnom kada nije prisutna dovoljna količina jezgrene DNA ili kada su u biološkim tragovima prisutne stanice bez jezgre, npr. dlaka bez korijena (1). Nekoliko osobina mitohondrijske DNA podupire njenu upotrebu u svakodnevnoj praksi, unatoč uspješnoj standardnoj STR analizi jezgrene DNA. Prvi razlog je njezina brojnost u svakoj stanici s aerobnim metabolizmom, zatim način nasljeđivanja koji omogućuje uzimanje referentnih uzoraka za usporedbu od daljih srodnika u obiteljskom stablu i naposljetku činjenica da se analiziraju dijelovi mtDNA dugi otprilike 300 pb što povećava vjerojatnost uspješne analize te naglašava vrijednost analize mtDNA kod uzoraka u kojima je DNA vrlo degradirana (5). S druge strane, osnovni nedostatak analize mtDNA predstavlja ograničena mogućnost pozitivne identifikacije, koja analizom hipervarijabilnih regija pri apsolutnom podudaranju između uzoraka omogućuje pozitivnu identifikaciju s vjerojatnošću od 0,995 ili manje (6). Analizu mtDNA može dodatno zakomplicirati pojava heteroplazme, ali s druge strane može povećati točnost identifikacije. Heteroplazma se definira kao prisutnost dvije ili više subpopulacija mtDNA u jedne osobe. Mitohondrijska DNA se danas uglavnom analizira metodom sekvenciranja (1). Postupci analize mtDNA u prvih nekoliko koraka identični su onima u analizi jezgrene DNA. Produkt PCR-a dobiven iz izdvojenog uzorka DNA sekvencira se Sangerovom metodom te se rezultati uspoređuju sa standardnom referentnom sekvencom, pritom proučavajući razlike. Popis tih razlika predstavlja mtDNA profil pojedinca. U slučaju podudarnosti profila prilikom usporedbe profila iz uzoraka, taj profil mora se usporediti s bazom podataka populacije i izračunati vjerojatnost podudarnosti (6).

1.2.3. Osnovne faze procesa DNA analize

Prije početka analize DNA u laboratoriju, svaki uzorak nužno je pažljivo i profesionalno prikupiti, pohraniti i transportirati. Ovi koraci su vrlo bitni jer uvelike određuju tijek i uspješnost daljnje analize. Nakon dostave uzorka koji sadrži biološke tragove u laboratorij, slijedi njihova obrada, ustanovljavanje fizičkih i kemijskih karakteristika, identifikacija tipa traga, a nakon toga slijedi izolacija DNA, tj. njezino izdvajanje od ostalih molekula u stanici i mogućih kontaminirajućih supstanci. Neke od korištenih metoda izolacije su izdvajanje DNA

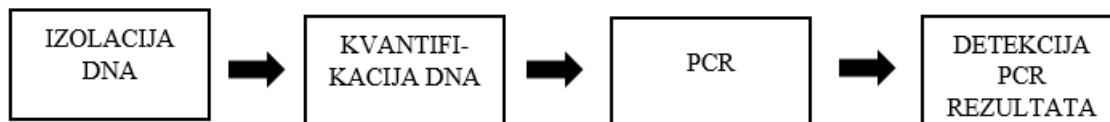
pomoću organskih otapala, izdvajanje „Chelex® 100“ metodom, „Qiagen®“ metodom , itd. (slika 3) (7).



Slika 3. Metode izolacije DNA (1)

Nakon izolacije DNA, slijedi korak kvantifikacije DNA kojim se utvrđuje količina DNA, njeno porijeklo te njezina čistoća. Ovaj korak je bitan jer su uzorci često kontaminirani bakterijskom DNA ili sadrže razne inhibitore PCR reakcije. Kvantitativnom PCR reakcijom u realnom vremenu (engl. *Quantitative Real Time PCR*, QRT - PCR) moguće je uspješno

kvantificirati humanu DNA i odrediti prisutnost inhibitora i stupanj inhibicije. Ova metoda, koja se zasniva na detekciji i kvantifikaciji fluorescentno obilježenog reportera čiji se signal mijenja ovisno o povećanju broja kopija produkata u PCR reakcijskoj smjesi, najviše je primjenjivana metoda kvantifikacije u forenzičnoj DNA analizi. Na tržištu su dostupni razni komercijalni kompleti od kojih su najzastupljeniji oni tvrtke Applied Biosystems poput Quantifiler™ Duo DNA Identification Kit. Sljedeći korak je umnažanje lančanom reakcijom polimerazom (PCR) (slika 4). Lančana reakcija polimerazom enzimatska je reakcija umnažanja određenog segmenta DNA kojom se dobiju milijarde identičnih kopija tog segmenta. Sastoji se od tri osnovne faze: razdvajanja polinukleotidnih lanaca (denaturacije), vezivanja početnica koje određuju fragment za umnažanje (hibridizacije) i komplementarnog vezivanja slobodnih dNTP-ova (produljivanje lanca). U reakcijskoj smjesi prisutni su i termostabilna polimeraza, PCR pufer i ioni magnezija. PCR reakcija odvija se pomoću instrumenata zvanih PCR-thermocycler, a na tržištu su brojni komercijalni multipleksni kompleti pomoću kojih je moguće u isto vrijeme analizirati više ciljanih genetičkih biljega. Najpoznatiji komercijalni kompleti za analizu autosomalnih STR lokusa proizvedeni su od strane tvrtki Applied Biosystems (AmpFISTR® linija), Promega Corporation (PowerPlex® linija) i Qiagen (Investigator linija). Nakon umnažanja PCR-om slijedi detekcija PCR rezultata. Detekcija je automatiziran proces koji se odvija na laboratorijskim instrumentima uz upotrebu softvera. Konačan rezultat cjelokupne analize je dobiveni genetički profil. U forenzičnoj DNA analizi detekcija PCR rezultata podrazumijeva detekciju alelnih varijanti na STR lokusima ili DNA sekvenciranje. Detekcija alelnih varijanti na STR lokusima je utvrđivanje broja ponavljanja kratkih ponavljajućih sekvenci. U spomenutim komercijalnim kompletima, STR lokusi označeni su s nekoliko boja, s tim da su dovoljno „udaljeni“ lokusi označeni istim bojama. U uzorke je dodan i interni veličinski standard, a kao referentni sustav služi alelna ljestvica koja sadrži sve detektirane alelne varijante na svim ispitivanim lokusima. Uzorci budu postavljeni na analitički instrument, a upotrebom softvera alelne varijante u uzorku odrede se i imenuju na osnovi internog veličinskog standarda i usporedbe s alelnom ljestvicom. Konačni DNA profil predstavljen je u obliku elektroferograma čiji pikovi predstavljaju alelne varijante na određenom lokusu. Danas se u većini laboratorija forenzične genetike koriste kapilarni genetički analizatori tvrtke Applied Biosystems poput ABI PRISM 3100, 3130 i 3500 genetičkih analizatora (7,8).



Slika 4. Faze procesa DNA analize

Za razliku od detekcije alelnih varijanti na STR lokusima koja podrazumijeva utvrđivanje broja ponavljanja određene kratke ponavljajuće sekvence, DNA sekvenciranje podrazumijeva utvrđivanje redoslijeda baza unutar lanca DNA (7). Automatsko sekvenciranje najbrži je, najjednostavniji i najprimjenjiviji oblik sekvenciranja, te se koristi za sekvenciranje velikih dijelova DNA, kao npr. kontrolne regije mtDNA ili za traženje SNP-ova. Ipak, sve tehnike sekvenciranja svoje osnove duguju Sangerovoj metodi (1).

1977. Frederick Sanger razvija metodu sekvenciranja koja se temelji na zaustavljanju enzimatske sinteze lanca DNA ugradnjom dideoksinukleotida (ddNTP), te za svoje otkriće dobiva i Nobelovu nagradu. Dideoksinukleotidi nemaju 3' OH skupinu, te se iz tog razloga kada polimeraza ugradi ddNTP u lanac prekida njegova sinteza. Reakcija sekvenciranja u početku se odvijala u četiri različite reakcijske smjese, svaka od kojih bi sadržavala lanac DNA s prajmerom, dNTP-ove i svaka po jednu vrstu ddNTP-ova, te bi se rezultati promatrali na gelu. DNA sekvenciranje značajno je pojednostavljeno uvođenjem fluorescentnog označivanja, automatizacijom sustava i korištenjem kapilarne elektroforeze (1,9).

2. MASIVNO PARALELNO SEKVENCIRANJE - MPS

Otkada je prvotno predstavljena Sangerova metoda sekvenciranja omogućila je veliki napredak i na području genetike te je koristeći upravo ovu tehnologiju uspješno završen i Projekt ljudskog genoma. Ipak, određeni nedostaci ove tehnologije poput niske propusnosti, visoke cijene i operacijskih poteškoća ograničavaju njenu upotrebu u kompleksnijim analizama. Razvitkom takozvanih metoda sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing* – NGS), koje se odlikuju visokom propusnosti te brzinom, postalo je moguće dovršiti projekte sekvenciranja genoma u znatno kraćem vremenskom roku. Time su značajno smanjeni troškovi sekvenciranja te su otvorena vrata za širu primjenu ovih metoda na mnogim područjima znanosti (10,11).

Pojam *next generation sequencing* tj. *massively parallel sequencing* – masivno paralelno sekvenciranje (MPS) odnosi se na metode sekvenciranja DNA s visokom propusnosti, gdje se milijuni ili milijarde DNA molekula mogu paralelno sekvencirati (10). Generalno, jedan od načina podjele MPS platformi jest onaj na tehnologije druge i treće generacije. Platforme druge generacije sve dijele zajedničku postavku gdje su DNA fragmenti sa specifičnim adapterskim sekvencama na oba kraja, povezani za podlogu (čvrstu podlogu ili sferu), zatim umnoženi i sekvencirani raznim metodama. Nasuprot tome, platforme treće generacije oslanjaju se na detektiranje sekvenci pojedinačne DNA molekule, a ne klastera klonalno umnožene DNA. Također, brzim napretkom MPS tehnologija pojavile su se nove platforme koje se temelje na očitavanju pojedinačnih molekula koristeći se tehnologijom *single-molecule* sekvenciranja, ali uz inkorporaciju *nanopore* tehnologije te se ovakve platforme u nekim podjelama svrstavaju u zasebne tehnologije četvrte generacije (12,13).

Isto tako, ove platforme možemo podijeliti na *short-read* i *long-read* platforme, s obzirom na duljinu očitavanja (14). Upravo ova podjela korištena je za prikaz platformi u nastavku.

2.1. Short-read

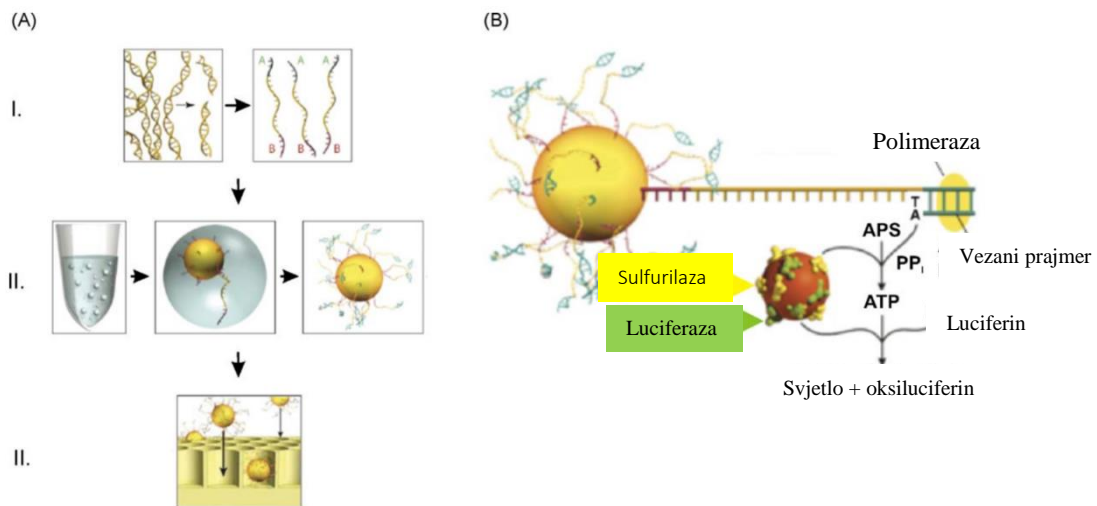
U *short-read* platforme ubrajamo metode temeljene na sekvenciranju sintezom i one temeljene na sekvenciranju ligacijom. Metode sekvenciranja ligacijom podrazumijevaju hibridizaciju i ligaciju obilježene probe i početnice za DNA lanac. Probe očitavaju jednu ili

dvije poznate baze i seriju općih baza te uzrokuju komplementarno vezanje probe i DNA predloška, dok je početnica komplementarna sekvenci adaptera i označava početno mjesto vezivanja. Nakon vezivanja snimanjem se određuju baza ili baze probe. U metodama sekvenciranja sintezom koristi se polimeraza, a identifikacija inkorporiranog nukleotida vrši se očitanjem signala poput fluorofora ili promjene u ionskoj koncentraciji. U oba spomenuta pristupa vrši se DNA amplifikacija tj. DNA se klonalno umnaža na podlozi. Ovaj korak je potreban jer će prisutstvo nekoliko tisuća identičnih kopija DNA fragmenta u određenom prostoru osigurati da se signal može izdvojiti od pozadinske buke. Stvaraju se tzv. klasteri tj. klonalne populacije DNA predložaka u bliskom prostornom odnosu. Postoji nekoliko različitih strategija za stvaranje klonalnih populacija DNA predložaka kao što su *bead-based*, *solid-state* i *DNA nanoball* tehnika. Prvi korak u stvaranju je fragmentacija DNA iz uzorka tj. razdvajanje većih DNA fragmenata u manje, što se može izvršiti mehanički (prolaskom DNA kroz uski prolaz), ultrazvukom ili enzimatski. Nakon fragmentacije slijedi vezivanje za zajednički set adaptera za klonalnu amplifikaciju i sekvenciranje (14). Nakon amplifikacije tisuće kopija svake od originalnih DNA molekula tvore klasterne koji su imobilizirani ili na granulama (u slučaju *bead-based* amplifikacije) ili direktno na podlogu (u slučaju *solid-state* amplifikacije). Svaki od tih klastera zatim može biti uspješno paralelno sekvenciran na nekoj od NGS platformi, od tuda dolazi i naziv masivno paralelno sekvenciranje (13).

2.1.1. Roche 454

Roche 454 bio je prvi komercijalno dostupni MPS sustav. Ovaj uređaj spada u skupinu metoda koje se koriste tehnologijom sekvenciranja sintezom, preciznije tehnologijom pirosekvenciranja. Umjesto korištenja dideoksinukleotida za terminaciju amplifikacije lanca, ova tehnologija koristi se detekcijom pirofosfata otpuštenog tijekom inkorporacije nukleotida (14,15). DNA fragmenti su vezani za specifične adaptore koji uzrokuju vezanje jednog fragmenta za granulu, zatim se fragmenti umnažaju emulzijskim PCR-om. Zatim će se na picotiter pločici jedan od dNTP-ova (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) komplementarno spariti sa bazama lanca koji se analizira uz pomoć ATP sulfurilaze, luciferaze, luciferina, DNA polimeraze i adenozin-5-fosfosulfata i oslobodit će pirofosfat koji odgovara količini inkorporiranog nukleotida. ATP iz pirofosfata pretvara luciferin u oksiluciferin i stvara se vidljivo svjetlo (slika 5). Također, neodgovarajući dNTP-ovi budu razgrađeni uz pomoć enzima apiraze. Zatim se novi dNTP dodaje u reakciju i reakcija se ponavlja (11,15). Glavna

prednost 454 platforme pred ostalim sistemima je duljina očitavanja sekvenci koja za GS FLX Titanium sistem iznosi i do 700 parova baza (15,16). Glavni nedostatak platforme je očitavanje homopolimera tj. uzastopnih ponavljanja iste baze (16).

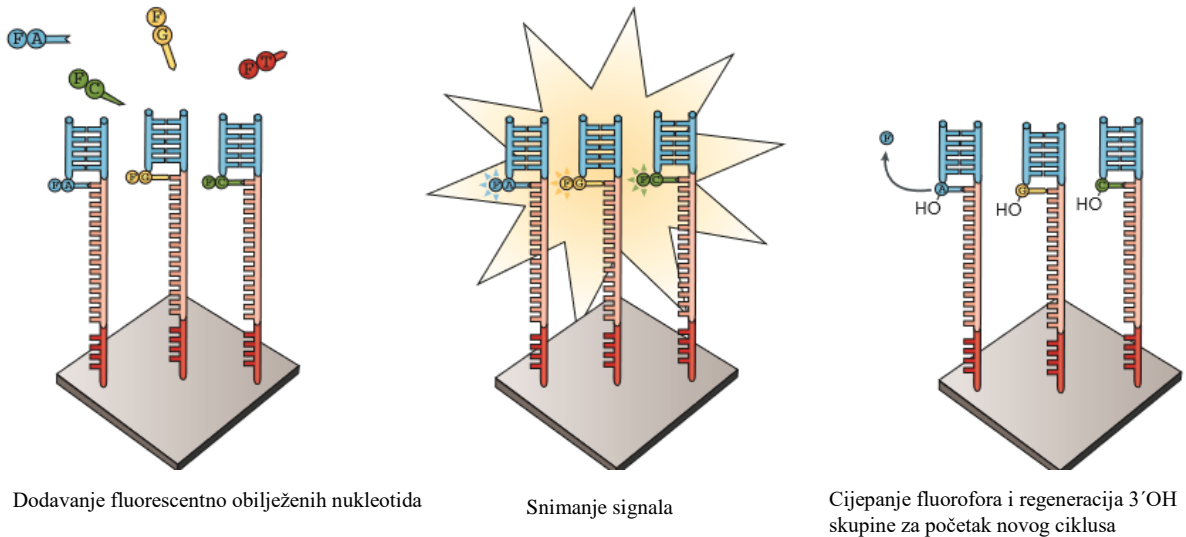


Slika 5. Princip rada 454 platforme (11)

2.1.2. Illumina platforme

Illumina Genome Analyzer također radi na principu sekvenciranja sintezom, koristeći fluorescentnim bojama obilježene reverzibilne terminacijske nukleotide za sve četiri baze i enzim DNA polimerazu za njihovu inkorporaciju. PCR amplifikacijom na površini se stvaraju klasteri kopija jednolančane DNA, zatim se na površinu dodaje smjesa za reakcije sekvenciranja i DNA sinteze koja sadrži prajmere, četiri reverzibilna terminacijska nukleotida obilježena fluorescentnim bojama i DNA polimerazu (11). Reverzibilni terminacijski nukleotidi su modificirani na način da na 3' hidroksilnoj skupini sadrže kemijski odcijepivi dio koji dopušta inkorporaciju samo jedne baze po ciklusu. Nakon inkorporacije nukleotida i očitavanja putem kamere, dolazi do kemijskog cijepanja tog dijela nukleotida i cijepanja fluorescentnog biljega i ciklus se ponavlja (slika 6) (16). Na ovom instrumentu duljina očitavanja sekvenci je 35 nukleotida, međutim ista tvrtka 2008. izdala je nadograđenu verziju Genome Analyzer II čime je među ostalim postignuto bolje očitavanje DNA klastera na većim područjima te smanjeno vrijeme izvođenja (11). Također, valja napomenuti da Illumina dominira tržištem *short-read* platformi i nudi širok izbor poput NextSeq, MiniSeq i HiSeq

platformi te mnoštvo opcija vezanih za vrijeme izvođenja, očitane strukture i duljinu očitanih sekvenci (14).

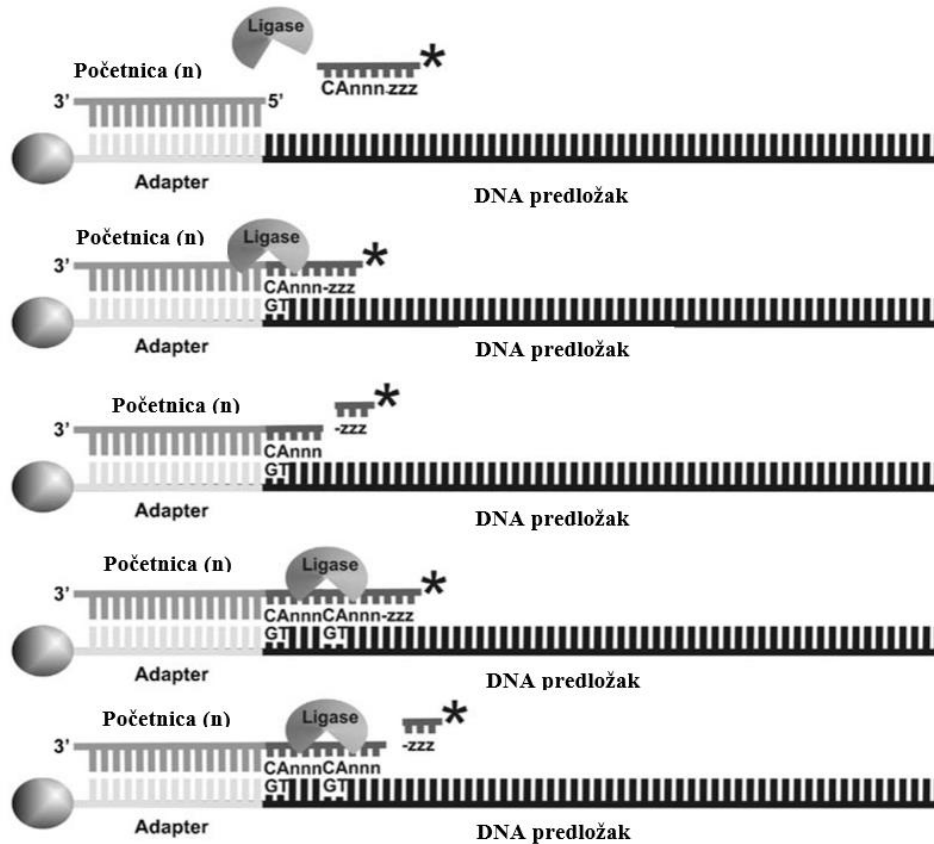


Slika 6. Sekvenciranje sintezom na Illumina platformi (14)

2.1.3. Applied Biosystems SOLiD sustav

Ova platforma zasniva se na tehnologiji sekvenciranja ligacijom. DNA fragmenti vezani za granule umnoženi su emulzijskim PCR-om te su granule položene na staklenu površinu. U prvom koraku se početnica hibridizira za adapter, zatim se mješavina oligonukletidnih oktamera hibridizira za DNA fragment i dodaje se ligacijska smjesa. Duplet četvrte i pete baze u oktameru je označen jednom od četiri fluorescentne oznake na kraju oktamera te se nakon njene detekcije tj. određivanja četvrte i pete baze dio oktamera nakon pete baze cijepa zajedno sa fluorescentnom oznakom (slika 7). Zatim se hibridizacijski i ligacijski ciklusi ponavljaju, određujući devetu i desetu bazu u sekvenci, zatim četrnaestu i petnaestu i tako dalje. Proces je zatim moguće nastaviti sa drugom početnicom, koja je za jednu bazu kraća od prethodne, te se na taj način uzastopno određuju baze tri i četiri, osam i devet, trinaest i četrnaest i tako dalje. Na taj način se postiže duljina očitavanja sekvenci od 35 baza, a broj pogrešaka je smanjen zato što je svaka baza određena drugačijom fluorescentnom oznakom (11). Isto tako, zbog toga što je svaka baza određena više puta ova tehnologija ima vrlo visoku

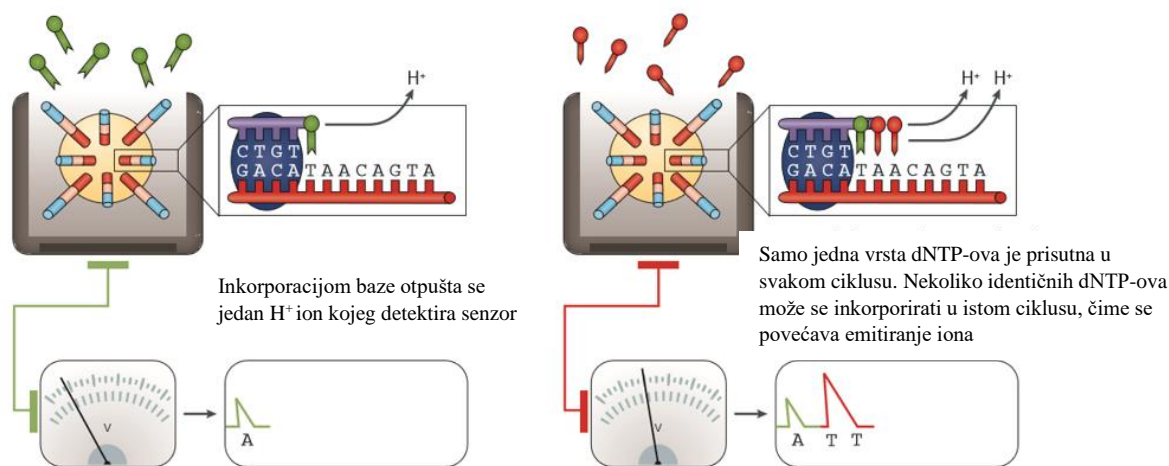
točnost (~99.99%), ali jedan od njezinih glavnih nedostataka jest upravo kratka duljina očitavanja (14).



Slika 7. Sekvenciranje ligacijom na Applied Biosystems SOLiD platformi (11)

2.1.4. Ion Torrent

Tehnologija spada u one sekvenciranja sintezom te se poput 454 platforme za detekciju služi očitavanjem signala koji nastaje inkorporacijom jednog nukleotida u rastući lanac. Ipak, razlika je u tome što se Ion Torrent platforma služi detekcijom H^+ iona koji se oslobađaju s inkorporacijom svakog dNTP-a (slika 8) (14). Ion Personal Genome Machine (PGM) instrument očitavanjem promjene u pH vrijednosti prepoznaje dodavanje nukleotida. Ovaj instrument ne koristi fluorescenciju i očitavanje kamerom te se zbog toga od ostalih izdvaja svojom brzinom, nižom cijenom i manjom veličinom (15).



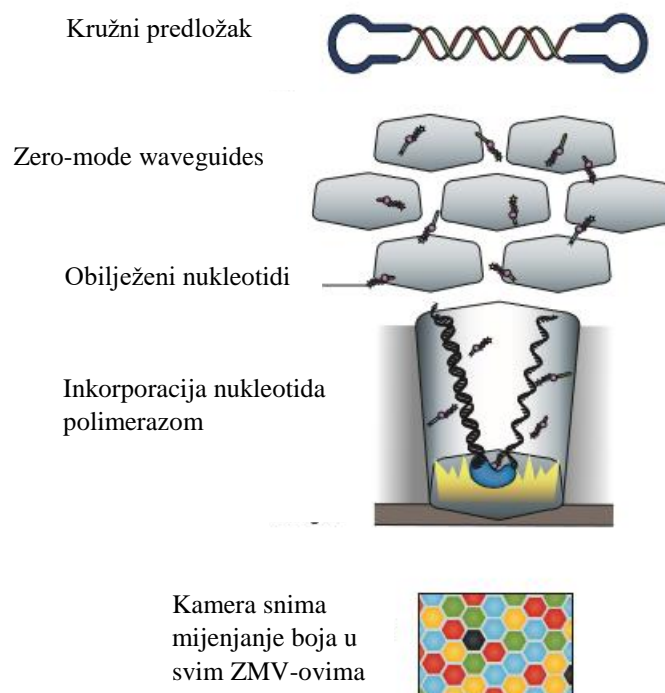
Slika 8. Ion Torrent sekvenciranje sintezom (14)

2.2. Long-read

Genom je pun dugih kompleksnih elemenata koje *short-read* platforme ne mogu uspješno očitati. Nasuprot tome, *long-read* platforme sa svojom mogućnosti očitavanja nekoliko kilobaza mogu ovaj problem uspješno riješiti. *Long-read* tehnologije možemo podijeliti na one koje se koriste *single-molecule* sekvenciranje i na one koje koriste tzv. sintetički pristup (14). *Single-molecule* sekvenciranje nekada se naziva i sekvenciranje treće generacije te ono ne zahtjeva umnažanje PCR-om prije sekvenciranja. Također, signal se hvata u realnom vremenu (15). Tehnologije koje koriste sintetički pristup ne proizvode duga očitavanja u pravom smislu riječi, već koriste tzv. barkodove, tj. serije poznatih baza koje se dodaju molekuli predloška te nakon sekvenciranja služe za identifikaciju uzorka iz kojeg je neka očitana sekvenca dobivena. Zapravo, sekvenciranje se vrši na postojećim *short-read* instrumentima, a poslije se na temelju barkodova kompjuterski slažu veći fragmenti. Jedne od najčešće korištenih platformi ove vrste su Illumina synthetic long-read platforma za sekvenciranje i 10X Genomics sistemi (14). Što se tiče platformi koje koriste *single-molecule* pristup u nastavku su prikazane PacBio i MiniON.

2.2.1. PacBio

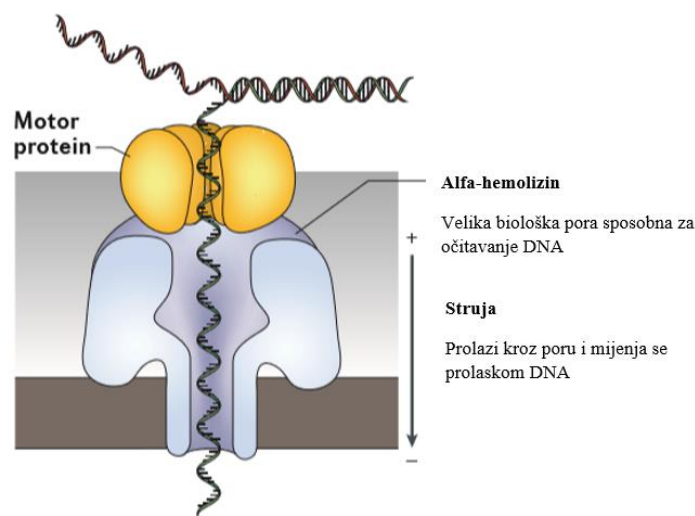
Pacific Biosciences (PacBio) platforma koristi SMRT (engl. *single-molecule real-time*) metodu sekvenciranja koja koristi modificirani enzim polimerazu i služi se direktnim promatranjem enzimatske reakcije u realnom vremenu (15). Temelji se na posebnim nanostrukturama tzv. *zero-mode waveguides* (ZMV), koje se sastoje od utora promjera nekoliko nanometara koji su usidreni na staklenoj površini. Na dnu utora fiksirana je DNA polimeraza (14). U jedan ZMV utor stane po jedan kompleks DNA polimeraze i DNA predložka te se sekvenciranje odvija koristeći četiri fluorescentno obilježena nukleotida. Kada se nukleotid ugradi u lanac, fluorofori budu pobuđeni laserima, kamera zabilježi signal te se odredi identitet nukleotida (slika 9). Na ovoj platformi se postižu očitavanja od više od 15 000 nukleotida, ali je prisutna visoka stopa pogreške (13). S obzirom na to da ova platforma koristi posebni kružni predložak koji omogućava da se svaki predložak sekvencira više puta, to omogućava određenu razinu ispravljanja pogrešaka (14).



Slika 9. PacBio metoda sekvenciranja (14)

2.2.2. MinION

MinION platformu na tržište je lansirao Oxford Nanopore Technologies (14). Tehnologija ove platforme temelji se na transportu DNA molekula kroz nanopore ugrađene u lipidni dvosloj ili sintetički polimer (slika 10) (13). Glavna prednost ovog uređaja je njegova veličina. To je mali uređaj, spojiv na računalo putem USB kabela čime je omogućena njegova portabilnost i primjena na teško pristupačnim lokacijama (14).



Slika 10. Oxford Nanopore Technologies metoda sekvenciranja (14)

2.3. Primjena masivnog paralelnog sekvenciranja u forenzici

Trenutno se MPS tehnologije primjenjuju uglavnom u biomedicinskim znanostima u istraživanju dijagnostike tumora, genetičkih poremećaja, bolesti, itd. (12). Ipak, konstantni napredak u razvitku ovih tehnologija otvorio je nova vrata za njihovu primjenu i u forenzičnim znanostima. U usporedbi s ostalim granama znanosti, forenzična analiza DNA susreće se s problemima poput malog broja kopija DNA molekule, visoko degradiranim i kontaminiranim uzorcima, a s druge strane potrebom za visokom točnosti i reproducibilnosti rezultata. Rutinske metode DNA analize korištene u svakodnevnoj forenzičnoj praksi suočene

su s brojnim poteškoćama te se upravo u tim ograničenjima vidi potencijalna korist primjene MPS tehnologija i u forenzičnim znanostima (10).

2.3.1. Analiza STR biljega primjenom MPS platforme

Analiza STR-ova standardna je i dobro uhodana metoda DNA analize u forenzičnoj genetici. Kako je već rečeno, STR biljezi analiziraju se PCR multipleksnim kitovima i detektiraju na instrumentima po principu kapilarne elektroforeze te se na taj način u većini slučajeva uspješno generiraju DNA profili (12). Ipak, postoje određeni nedostaci i izazovi ovakvog načina STR analize u forenzičnoj genetici. Jedan od potencijalnih problema je taj što već spomenute baze podataka temeljene na STR-ovima rastu velikom brzinom, čime se povećava vjerojatnost slučajnog podudaranja. Rješenje problema leži u uvrštavanju još STR biljega u standardne testove, ali rutinska STR analiza temeljena na kapilarnoj elektroforezi imala bi problema u istovremenoj detekciji još više STR biljega tj. u razlikovanju alela iste ili slične dužine, a različite sekvence (10).

Određena istraživanja dokazala su uspješnu primjenu MPS platformi za analizu STR-ova time pokazujući kako bi ovakve tehnologije mogle nadvladati određena ograničenja standardne STR analize temeljene na kapilarnoj elektroforezi. MPS analiza STR-ova omogućava istovremenu analizu više biljega, razlikovanje alela iste veličine na osnovi varijacija unutar slijeda te povećava mogućnost uspješne analize mješavina ili degradiranih uzoraka DNA (17).

U istraživanju iz 2012. godine Van Neste i suradnici uspoređivali su rezultate komercijalnog STR kompleta analiziranog kapilarnom elektroforezom i sekvenciranjem na Roche GS FLX platformi i to za uzorke s jednim donorom i za mješavine sa više donora u različitim omjerima. Kvalitativni i kvantitativni rezultati sekvenciranja bili su usporedivi s onima kapilarne elektroforeze, s tim da su se rezultati sekvenciranja pokazali informativnijima u smislu određivanja podtipova alela na osnovi STR sekvenci u bazama podataka. U slučaju mješavina sa više donora, uspješno su određeni svi aleli pojedinaca koji čine barem 10% mješavine (18).

Velika prednost sekvenciranja pred rutinskom analizom PCR-om i kapilarnom elektroforezom (PCR-CE analiza) je ta što se sekvenciranjem otkrivaju prave varijacije STR lokusa. MPS analizom u slučaju i jednostavnih i složenih STR-ova pronađeni su novi, do tada nepoznati

aleli. Složeni STR-ovi sastoje se od različitih pod-ponavljanja. U slučaju da su pojedinačna pod-ponavljanja polimorfna onda je broj mogućih alela puno veći nego kod jednostavnih ponavljanja (13). U jednom istraživanju složenog STR lokusa D21S11, MPS-om je u analiziranim uzorcima detektirano dvadeset različitih D21S11 alela, dok ih je samo trinaest detektirano standardnom analizom. Također, identifikacija različitih sastava pod-ponavljanja u nekoliko D21S11 alela identičnih dužina omogućila je otkrivanje mutiranih roditeljskih alela u slučaju određivanja očinstva i time omogućila razlikovanje među pojedincima s alelima identičnih dužina. Ovim istraživanjem dokazana je snaga primjene MPS-a u forenzici te je pokazano da bi inkorporacijom više kompleksnih STR lokusa u standardne setove poput CODIS-ovog potencijal ovih tehnologija bio još i više iskorišten. Jer takvi aleli koje je lakše identificirati donijeli bi više statističke moći i posljedično smanjili broj lokusa koje je potrebno analizirati za rješenje određenog slučaja te omogućili lakšu analizu mješavina (19). U sličnom istraživanju, sekvenciranjem druge generacije ispitana su četiri kompleksna STR lokusa: D2S1338, D3S1358, D12S391 i već spomenuti D21S11. Sekvenciranjem je unutar sva četiri lokusa pokazana visoka varijacija sekvenci te je zaključeno kako ova četiri lokusa predstavljaju dobre kandidate za buduće SGS (*second generation sequencing*) kitove za forenzičnu genetiku (20).

Što se tiče interpretacije mješavina, sekvenciranje kompleksnih STR-ova sa mnogim alelima istih dužina moglo bi olakšati analizu u slučaju da donori imaju alele istih veličina s drugačijim sastavom sekvence ili ako pravi alel manje zastupljenog donora ima drugačiju sekvencu od stater artefakta većinskog donora (13). Također, MPS-om moguće je multipleksirati više uzoraka u isto vrijeme, te analizirati milijune pojedinačnih DNA ulomaka u DNA mješavini, što bi u teoriji također moglo omogućiti bolju analizu mješavina (21).

U početku je većina istraživanja STR-ova NGS-om koristila Roche/454 platforme zbog njihove duljine očitavanja od 500 do 1000 pb, ali kako je Roche 2015. najavio njeno ukidanje, fokus istraživača se pomakao na traženje novih platformi za ovakve analize. Jedna od takvih je i Ion Personal Genome Machine (Ion PGM, Thermo Fisher). Njegova jeftina cijena i kratko vrijeme analize idu u prilog njegovoj potencijalnoj široj primjeni u forenzičnoj DNA analizi. Također, ista tvrtka je radila na razvoju multipleksnih sustava bitnih forenzičnih STR-ova čiji su prajmeri specifično dizajnirani za SGS (*second generation sequencing*) analizu te među prvima omogućila prvo potpuno integrirano rješenje za SGS STR analizu od PCR-a pa sve do analize podataka na njihovom softveru. Upravo su se ovom platformom i njihovim posebno razvijenim panelom od 10 forenzični značajnih STR-ova u svom istraživanju koristili Fordyce

i suradnici. Jedno od bitnih saznanja proizašlo iz ovog istraživanja je činjenica da su upotrebom tog panela uspješno dobiveni puni profili iz uzoraka stvarnih kriminalnih slučajeva kod kojih je samo parcijalni profil bio dobiven PCR-CE analizom (22).

Primjena MPS tehnologija u analizi STR-ova svoju korisnost dokazuje i u analizi degradiranih uzoraka. Pošto se određivanje lokusa ne zasniva na veličini kao u slučaju analize kapilarnom elektroforezom, u MPS-u je moguće stvoriti amplikone kraće i sličnije po dužini jer je za identifikaciju alela bitna sama sekvenca, a to amplikone čini podobnijima za analizu izazovnih uzoraka (23). U istraživanju iz 2016. godine Kim i suradnici MPS tehnologijom analizirali su, između ostalog, i umjetno degradirane uzorke. Razvili su multipleksni PCR sustav za MPS analizu 18 STR biljega stvarajući amplikone veličine od 77 do 210 parova baza. Usporedbom genotipova dobivenih analizom kapilarnom elektroforezom i MPS-om kod ovih umjetno degradiranih uzoraka utvrđena je veća osjetljivost u slučaju MPS metode. Razvijenim mutipleksnim PCR sustavom uspješno su dobiveni cijeli profili iz degradiranih uzoraka, dok su u slučaju kapilarne elektroforeze dobiveni parcijalni profili što je potvrdilo korisnost razvijenih amplikona manje veličine (17).

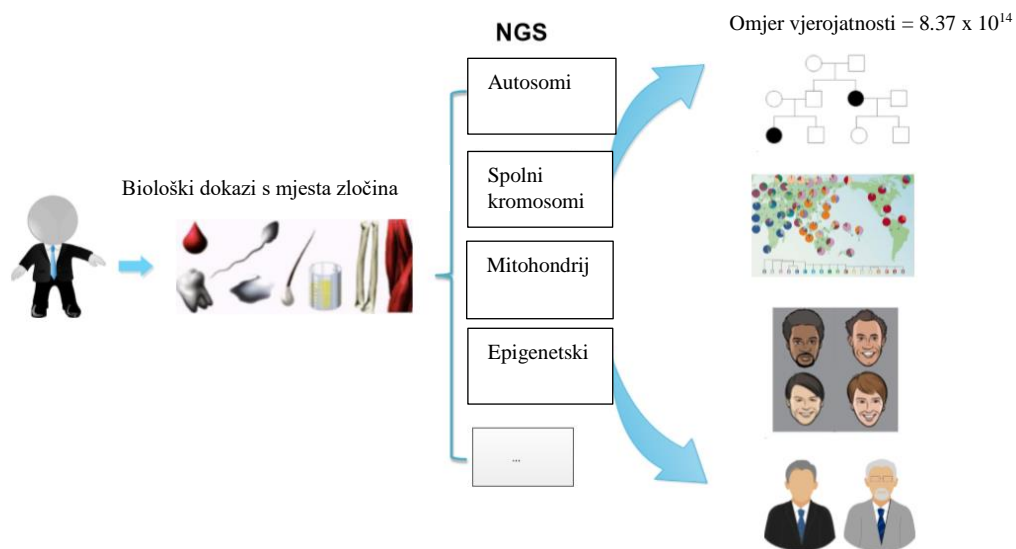
2.3.2. Analiza SNP biljega primjenom MPS platforme

Značajke koje odlikuju tehnologije MPS-a čine ih podobnim i za uporabu u analizi SNP-ova. Naime, svi postojeći pristupi u analizi SNP-ova imaju određena ograničenja, a ono koje se najviše ističe kod svih je nemogućnost ispitivanja velikog broja SNP-ova u jednoj analizi (24). Kao potencijalno rješenje nameće se masivno paralelno sekvenciranje. Područje u kojem se ovakav način analize SNP-ova može pokazati korisnim je forenzična DNA fenotipizacija. Naime, istraživanjima genoma identificirani su određeni SNP-ovi pomoću kojih se mogu predvidjeti etnička pripadnost i određene fizičke karakteristike osobe (12). O tome će više biti riječi u zasebnom poglavlju o forenzičnoj DNA fenotipizaciji.

Analiza autosomnih SNP-ova u svrhe ljudske identifikacije u forenzičnim istragama suočava se sa raznim izazovima. Bi-alelni SNP-ovi manje su polimorfni od multi-alelnih STR-ova te su zbog toga manje informativni u slučajevima analize mješavina DNA. Upravo bi upotreba većeg broja SNP-ova u odnosu na STR-ove u kombinaciji s multipleksnim tehnologijama mogla nadoknaditi ovaj nedostatak (25).

Isto tako, u slučajevima analize degradirane DNA u kojoj nije bilo moguće dobiti zadovoljavajući STR profil, kao korisna zamjena pokazala se analiza SNP-ova. Kao što je već rečeno SNP-ovi se odnose na zamjenu samo jedne baze, stoga je za analizu moguće koristiti jako kratke PCR amplikone od 50 nukleotida ili manje (25). Razvojem MPS tehnologije povećava se broj biljega koje je moguće istovremeno analizirati što otvara vrata za širu primjenu SNP biljega u forenzičnim analizama. 2014. lansiran je komercijalni multipleksni SNP test za ljudsku identifikaciju za Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) platformu koji omogućava simultanu analizu 90 autosomnih i 30 Y-SNP biljega odabranih u svrhu forenzične identifikacije. Gettings i suradnici su 2015. analizirali izvedbu HID-Ion AmpliSeq™ Identity Community Panel (v2.3) na Ion PGM platformi kod uzoraka degradirane DNA. Rezultati su pokazali potencijal primjene netradicionalnih biljega u analizi degradiranih DNA uzoraka. HID SNP test je pokazao moć diskriminacije sličnu onoj punog STR-profila i to koristeći fragmente manje od 150 pb, što bi bilo problematično u slučaju analize STR profila (26).

Spominjući primjene MPS-a u analizi raznih biljega, treba napomenuti da velika moć primjene MPS-a u forenzičnoj genetici leži u mogućnosti kombiniranja velikog broja različitih biljega u istoj analizi. Ograničenja rutinskih tehnologija analize genetičkih biljega ne dopuštaju simultanu analizu velikog broja genetičkih biljega. Tehnologije MPS-a nadilaze ova ograničenja i otvaraju put mogućnosti simultane analize standardne autosomne DNA (STR-ovi, SNP-ovi), mitohondrijske DNA, te X i Y-kromosomnih markera (27).



Slika 11. Informacije koje se mogu dobiti MPS analizom bioloških tragova (10)

Na tom tragu je u siječnju 2015. godine Illumina lansirala novu platformu MiSeq FGx™ Forensic Genomics System. Ova platforma predstavlja prvi potpuno validirani sistem za sekvenciranje koji je posebno dizajniran za primjenu u forenzičnoj genetici. Sistem dolazi s Forenseq™ DNA Signature Prep kitom i omogućava istovremeno sekvenciranje 230 lokusa, uključujući 152 identitet-informativna biljega od toga 27 autosomnih STR-ova, 7 STR-ova X-kromosoma i 24 STR-a Y-kromosoma i 94 identitet-informativna SNP-a; plus još 56 podrijetlo-informativnih i 22 fenotip-informativna SNP-a. Iste godine, Caratti i suradnici su u svojoj studiji podudarnosti usporedili uzorke prethodno testirane na ABI Prism 3130 genetičkom analizatoru sa GeneMapper ID-X v1.2 softverom sa rezultatima 22 autosomna STR biljega i 27 STR biljega spolnih kromosoma sekvencirana koristeći Forenseq DNA Signature Prep kit i analizirana koristeći Forenseq Universal Analysis softver. Svi analizirani uzorci su pokazali su podudarnost genotipova analiziranih kitovima za kapilarnu elektroforezu i onih analiziranih Forenseq DNA signature Prep kitom, s tim da su se sekvenciranjem dobile dodatne informacije o varijacijama unutar sekvenci za neke STR alele čime je povećana diskriminacijska moć. Snaga ovog kita leži u mogućnosti istovremene analize velikog broja biljega u jednoj analizi što omogućuje bolju optimizaciju DNA uzorka s mjesta događaja, a pri tome ima mogućnost pružiti dodatne informacije o podrijetlu i fenotipskim karakteristikama osobe od koje trag potječe (slika 11) (28).

2016. Calafell i suradnici koristili su ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit na MiSeq FGx™ platformi za analiziranje uzoraka iz masovnih grobnica Španjolskog građanskog rata (1936.-1939.). U ovakvim slučajevima pokušaja identifikacije ostataka od prije mnogo godina, problem ne predstavlja samo moguća degradacija uzoraka već i pronalazak žive rodbe za usporedbu profila. U ovom istraživanju zaključeno je kako je spomenuta tehnologija primjenjiva za identifikaciju rođaka do drugog koljena, čak i u slučajevima niskog učinka sekvenciranja i ispadanja alela, što je često slučaj kod degradiranih uzoraka (29).

2.3.3. Analiza mtDNA primjenom MPS platforme

Razvitak MPS tehnologija već pokazuje pozitivan utjecaj i u području analize mitohondrijske DNA. Takve tehnologije potencijalno će omogućiti prikupljanje i više podataka iz mtDNA i to brže i jeftinije od standardno korištenih metoda (30). MPS omogućava očitavanje cjelokupnog mitohondrijskog genoma s puno manje troškova od tradicionalnih metoda i ne

zahtjeva veliku količinu uzorka, te će omogućiti razlikovanje među uzorcima s istim sekvencama kontrolne regije analizom polimorfizama u kodirajućoj regiji koju se ne ispituje Sangerovim sekvenciranjem (12).

Već je rečeno kako je STR analiza trenutno najviše korištena metoda za identifikaciju osoba u forenzičnoj praksi. Ipak, u slučaju jako degradirane DNA iz uzoraka tragova loše kvalitete ili loše očuvanih ljudskih ostataka STR analiza nailazi na brojne prepreke koje mogu rezultirati lošim ili nikakvim DNA profilom. Neki od tih problema su kontaminacija, neuspjela amplifikacija (ispadanje alela ili lokusa) ili razni artefakti. Iako se takvim problemima može doskočiti korištenjem mini-STR kitova ili optimizacijom uvjeta PCR reakcije, uspjeh STR analize degradiranih uzoraka nije zagarantiran. Mitohondrijska DNA posjeduje određene osobine koje je čine podobnom za ljudsku identifikaciju i dobrim rješenjem u ovakvim slučajevima, ponajprije zbog prisutnosti tisuća kopija mtDNA u stanicama te se ona pokazala kao dobro rješenje u analizi uzoraka gdje se pojavila DNA fragmentacija ili je ukupni broj kopija DNA malen. Također, zbog prirode nasljeđivanja mtDNA kao uzorak za usporedbu mogu poslužiti udaljeniji rođaci s majčine strane što može biti jako korisno u slučajevima nestalih osoba kada nisu dostupni odgovarajući ante-mortem uzorci ili uzorci obitelji za usporedbu. Standardne procedure sekvenciranja mitohondrijskih hipervarijabilnih regija I i II su dugotrajne, zahtjevne i skupe. Također, nedostatak analize samo hipervarijabilnih regija je taj što su kratke sekvence iz ovog jednog lokusa puno manje moćne u smislu identifikacije nego puni STR profil od više lokusa. Kada se uzme u obzir da mnogi pojedinci unutar populacije često dijele zajedničku haplogrupu, jasno je zašto bi ovo moglo predstavljati problem. Istraživanja sekvenciranjem cijelog mitohondrijskog genoma su pokazala da više od 70% varijacije mtDNA može biti smješteno izvan hipervarijabilnih regija I i II za neke haplogrupe. Prema tome, sekvenciranje čitavog mitohondrijskog genoma puno je informativnija metoda u procesu ljudske identifikacije i individualizacije (31).

Templeton i suradnici u svom su istraživanju htjeli sekvencirati čitave mitohondrijske genome iz uzoraka ljudskih koštanih ostataka starosti u rasponu od 10 do 2500 godina. MPS-om su sekvencirali čitavi mitohondrijski genom uzoraka kod kojih standardna STR analiza ili sekvenciranje hipervarijabilnih regija nisu dale zadovoljavajuće rezultate. Time su nedvojbeno potvrdili korisnost sekvenciranja čitavog mitohondrijskog genoma za ljudsku identifikaciju u slučajevima jako degradiranih uzoraka (31).

Mitohondrijska DNA korisna je i u slučajevima analize miješanih uzoraka. Njegova haploidna priroda, osim u slučajevima heteroplazme, omogućava procjenu broja različitih donora u

mješavini. Ipak, određivanje broja različitih sekvenci mtDNA u mješavini koristeći klasične metode analize može biti izazovno. Potencijalno rješenje krije se u korištenju MPS tehnologija koje daju digitalne zapise zasnovane na broju očitavanja za svaku pojedinačnu mtDNA sekvencu. Isto tako, istraživanja su pokazala da je MPS osjetljiviji u detekciji niže zastupljene komponente u mješavini. U analizi mješavina pomoću mtDNA nadvladavaju se određeni problemi analize jezgrenih biljega, ipak u obzir treba uzeti i heteroplazmu (32).

Još jedna prednost MPS-a pred standardnim metodama u slučaju mtDNA je detekcija heteroplazme. Prisutstvo heteroplazme, odnosno dva ili više mitohondrijskih genotipa u stanici ili u jedinki, toliko je rijetko da ga se uglavnom ne može detektirati standardnim tehnologijama za analizu mtDNA. Detekcija varijanti heteroplazmi u podacima sekvenciranja je bila ograničena na one s učestalošću pojavljivanja većom od 10-20 %. Bolje razrješavanje u detekciji heteroplazme potencijalno će dovesti do veće diskriminacijske moći u forenzičnim slučajevima. Posljedično tome, okrenulo se novim tehnologijama te je pojavom MPS tehnologija sada moguće jasno identificirati heteroplazmatske varijante kod puno nižih razina nego prije. Brojnim istraživanjima dokazan je potencijal primjene MPS tehnologija u analizi mtDNA. Istraživanja su uglavnom rađena na platformama Roche 454, Illumina GAI, Illumina HiSeq 2000, Ion Torrent PGM te nešto na Illumina MiSeq platformi (33).

Tako su Parson i suradnici usporedili sekvenciranje mitohondrijskog genoma koristeći Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) te rezultate usporedili s onima standardnog sekvenciranja koje se zasniva na Sangerovoj metodi te su ustvrdili visoku podudarnost među analiziranim podacima, s razlikama manjim od 0.02 % (30).

2.3.4. Analiza Y kromosoma primjenom MPS-a

Što se tiče istraživanja Y-kromosoma i MPS tehnologija, većina se otkrića odnosi na nove, do tada nepoznate Y-SNP-ove koji su bitni za filogeniju Y-kromosoma i nomenklaturu haplogrupa koje se koriste za forenzična i antropološka istraživanja (12). Također, u jednom istraživanju korištenjem MPS tehnologije uspoređivano je više od 10 milijuna nukleotida Y kromosoma između dva pojedinca koja dijele istog pretka prije 13 generacija. Pronađene razlike ukazuju na mogućnost da bi se sekvenciranjem Y kromosoma mogao riješiti problem razlikovanja u miješanim muškim uzorcima od istog roditelja (10).

2.3.5. Analiza mikrobioma primjenom MPS-a

Nakon napada pismima antraksa 2001. godine u SAD-u razvijeno je novo znanstveno polje forenzike mikroorganizama. Forenzika mikroorganizama uključuje mrežu više znanstvenih disciplina i koristi znanstvene metode analize dokaza slučajeva u koji uključuju neku mikroorganizama vrstu sa svrhom utvrđivanja izvora ili krivca. Iako se u početku pojam forenzike mikroorganizama odnosio uglavnom na bioterorizam i biozločin, došlo je do proširivanja uporabe mikroorganizama u forenzične svrhe te on sad uključuje među ostalim i identifikaciju ljudi i procjenu postmortem intervala. Posebno zanimljiva je analiza mikrobioma (34). Proučavanje mikrobioma uključuje analizu DNA mikroorganizama mikrobioma koji uključuje uglavnom bakterije, ali i druge mikroorganizme koji nastanjuju površinu i unutrašnjost ljudskoga tijela. Razvitak MPS tehnologija donio je velik napredak i u ovom polju istraživanja i omogućio bolje razlikovanje vrsta mikroorganizama (35). Ljudi mikroorganizme ostavljaju za sobom baš kao i svoju DNA, a ti složeni mikrobni genomi iz različitih mikroorganizama predstavljaju jedinstvene potpise pojedinca i mogu pružiti visok stupanj individualizacije (34). Mikrobiom pojedinca oblikuju jedinstveni genetički faktori i faktori okoliša te zbog toga mikrobiom može biti jedinstven svom domaćinu (36). Mikrobiom se čak razlikuje i u jednojajčanih blizanaca što otvara nove mogućnosti u forenzičnoj identifikaciji osoba. Iako je dokazano da se mikrobiom pojedinca mijenja tijekom vremena, čak i ova činjenica može biti korisna u smislu dobivanja saznanja o stilu života pojedinca jer na mikrobiom utječu faktori poput prehrane, zanimanja, putovanja i lijekova (37).

Zanimljiva je dinamika izmjene mikroorganizama čovjeka i okoliša. Istraživanjima je dokazano da čovjek direktnom interakcijom može mijenjati bakterijsku kompoziciju okoliša, ali i da bakterije iz okoliša mogu izmijeniti mikrobiom čovjeka koji ga nastanjuje. Čovjekov mikrobni potpis može se detektirati u prostoriji čak i mjesecima nakon interakcije. Također, izmjena mikrobioma čovjeka i okoliša vidljiva je i kod stvari s kojima je čovjek u svakodnevnom bliskom kontaktu pa je tako dokazano da mikrobiomi sa tipkovnica ili telefona djelomično dijele mikrobni potpis čovjeka koji ih koristi. Skladno tome, ljudi međusobno te ljudi i životinje koji žive zajedno također imaju slične potpise. U smislu primjene u forenzici ova saznanja su bitna za potencijalno povezivanje osobe, predmeta i mjesta događaja (35).

Potencijalnu primjenu u forenzici ima i proučavanje mikrobioma crijeva. Iz uzorka npr. fecesa mogao bi se dobiti mikrobiomni profil u svrhu identifikacije ili bi isti mogao pružiti

informacije o nedavnoj prehrani ili geolokaciji. Također, proučavanje jedinstvenih genetičkih potpisa bakterija moglo bi biti korisno u određivanju izvora tkiva biološkog uzorka, a bakterije nosa i grla mogle bi biti korisne u pružanju informacija o geografskoj lokaciji ili nedavnom kontaktu (34). Različita geografska mjesta imaju različit sastav zajednica mikroorganizama te zbog toga analiza mikrobioma čovjeka ili određenog okoliša može pomoći pri utvrđivanju njihove geografske lokacije (35). Istraživanja su pokazala kako se sastav mikrobioma mijenja tijekom vremena, te da su mikrobiom crijeva i sline konzistentniji od kože. Osim crijeva, usne šupljine, kože i urogenitalnog trakta koji su istraženi u Projektu ljudskog mikrobioma (*Human Microbiome Project*) počela su istraživanja i na drugim mjestima tijela koja mogu biti od forenzičnog značaja, kao što su skalp i stidne dlake. Još jedno značajno područje u kojem je analiza mikrobioma potencijalno korisna je i određivanje postmortem intervala. Naime, istraživanjima je pokazano kako se karakteristični bakterijski taksonomski potpisi mogu odrediti u različitim vremenskim okvirima i na raznim lokacijama na tijelu (35).

Kao i na ostalim područjima znanosti, masivno paralelno sekvenciranje je donijelo ogroman napredak i na području mikrobiologije omogućivši sekvenciranje mješavine milijuna molekula DNA u jednoj analizi te brzu analizu zajednica mikroorganizama, čak i onih vrsta koje se ne mogu uzgojiti u laboratoriju. Primjena tih tehnologija omogućila je dobivanje kompletnog uvida u populaciju mikroorganizama iz uzorka identifikacijom različitih sojeva bakterija, smanjujući pri tome cijenu analize i nadilazeći brojna ograničenja ranije korištenih metoda (38). MPS tehnologije mogu se koristiti za karakterizaciju bilo kojeg mikroorganizma čak i kada je prisutan u tragovima ili degradiran te predstavljaju odličan alat i za analizu ljudskog mikrobioma (34).

Primjena mikrobioma u forenzici još se detaljno istražuje, ali jasno je da bi u budućnosti ovakva analiza mogla poslužiti kao pomoć i dopuna standardnom DNA profiliranju. Do tada je pak potrebno uložiti napore u smislu razvijanja tehnologije, standardizacije, ali i baze podataka mikroorganizama (37). Osim za samu upotrebu mikrobioma u forenzici, validacija je potrebna i ako govorimo o korištenju tehnologija masivnog paralelnog sekvenciranja za njihovu analizu (38).

2.3.6. Primjena MPS-a u određivanju fenotipskih karakteristika

Trenutni pristup forenzičnog DNA profiliranja analizom genetičkih biljega omogućava identifikaciju osoba koje su već poznate istražnim vlastima, bilo da je profil za usporedbu već dostupan u nekoj od baza podataka ili izuzet od sumnjivca u istrazi. Međutim, takav pristup ovisi o kvaliteti i širini dostupnih baza podataka i uspješnosti same istrage. Pristup koji može uvelike pomoći usmjeriti istrage u smjeru pronalaska nepoznatih osoba je tzv. forenzična DNA fenotipizacija. DNA fenotipizacija podrazumijeva dobivanje informacija o vanjskim vidljivim obilježjima pojedinca direktno iz analize DNA uzorka. U istragama bi ovakav pristup olakšao potragu za nepoznatom osobom smanjujući krug mogućih sumnjivaca, također bi bio koristan i u identifikaciji nestalih osoba uključujući i žrtve masovnih katastrofa (25).

DNA fenotipizacija podrazumijeva ispitivanje SNP molekularnih biljega. Iako su većina SNP-ova tzv. „tihi biljezi“ i nemaju utjecaja na ulogu gena ili fenotip, otkriveno je kako neki SNP-ovi mogu utjecati na fenotip i povezani su s vidljivim obilježjima poput visine, kose, ali i sa podložnostima za neke bolesti poput dijabetesa ili shizofrenije. Ipak, mnoga obilježja poput boje očiju, kose, kože i visina su složena obilježja te ovise o nekoliko gena i o raznim vanjskim utjecajima poput okoline, godina i prehrane. Najviše istražene karakteristike su upravo boja očiju, kose i kože. Pigmentacija je složeno obilježje, a pigment melanin je taj koji utječe na boju očiju, kose i kože. Za njegovu sintezu odgovorno je više od sto gena, a na pigmentaciju utječu i bolesti, lijekovi, dob i UV svjetlost. U europskim populacijama osobe koje imaju smeđe ili plave oči mogu imati različite boje kose, a kod populacija s tamnijom kožom uglavnom dolazi i tamnija boja očiju i kose. Zbog ovoga su se istraživanja uglavnom usredotočivala ili na jedno obilježje u jednoj populaciji ili na nekoliko gena. Tako su se istraživanjima europskih populacija u vezu s bojom očiju doveli OCA2 lokus i HERC2 gen, te su se njihovim detaljnim mapiranjem identificirala dva SNP-a, rs12913832 i rs1129038, koji pokazuju jaku povezanost s plavom, odnosno smeđom bojom očiju. Od svih karakteristika upravo boja očiju ima najbolja predviđanja te je prediktivna vrijednost za SNP rs12913832 0,899 za smeđe oči i 0,877 za plave. Na temelju toga, razvijen je „IrisPlex“ sistem za predviđanje boje očiju koji uključuje multipleksni test za 6 najprediktivnijih SNP-ova iz 6 pigmentacijskih gena te statistički model i bazu podataka za pouzdano predviđanje boje očiju. Bitno je spomenuti kako je taj test validiran i dostupan za forenzičnu upotrebu. Što se tiče boje kože, koja je još složenija karakteristika, *skin-color-predictor* test upotrebljava sedam

SNP-ova za predviđanje boje s opcijama „ne svijetla“ i „ne tamna“. Kod predviđanja boje kose, najtočnije predviđena boja je crvena boja kose koja je uvelike određena jednim genom MC1R. Test „HIrisPlex“ predstavlja proširenu verziju IrisPlex testa s 18 novih SNP-ova za predviđanje boje kose. Taj test je u jednom istraživanju na 308 osoba imao 69,5 % točnih predviđanja za plavu kosu, 78,5 % za smeđu, 87,5 % za crnu i 80 % za crvenu kosu. Osim boje očiju, kože i kose, brojna istraživanja bave se i visinom. Zaključeno je kako je utjecaj pojedinačnih SNP-ova na visinu minimalan, a da utjecaj svih SNP-ova koji utječu na visinu zajedno određuje oko 45% varijacija povezanih s visinom (25, 39).

Osim SNP-ova za predviđanje fenotipskih karakteristika, postoje i oni za povezivanje osobe s određenom populacijom, a raznim istraživanjima se neprestano otkrivaju novi SNP-ovi pomoću kojih je moguće odrediti npr. kovrčavost kose, ćelavost ili pjegavost, a ide se u smjeru predviđanja morfologije lica. Kombinacija svih ovih biljega potencijalno pruža ogromnu količinu vrijednih informacija o osobi od koje trag potječe (25, 39). Očito je kako forenzična DNA fenotipizacija ima velik potencijal primjene u forenzici. Nedostatak tehnologija za paralelnu analizu velikog broja SNP-ova pogodnih za forenzične uzorke DNA niske kvalitete i male količine predstavljao je problem za daljnji razvitak forenzične DNA fenotipizacije. Upotreba MPS tehnologija omogućava ciljanu multipleksnu analizu velikog broja SNP-ova, a takav će pristup vjerojatno biti potreban u budućnosti za detaljnije predviđanje izgleda jednom kad se istraživanjima genetskih osnova raznih vidljivih karakteristika izgleda odrede za to potrebni DNA biljezi (40).

2.3.7. Ostale primjene MPS-a u forenzici

Osim poviše spomenutih, istražuju se i brojne druge potencijalne primjene MPS-a u forenzici. MPS tehnologije mogu proširiti forenzičnu istragu na polje forenzične medicine. Tako npr. sekvenciranje može pomoći pri pronalasku genetičkih varijanti povezanih sa određenim bolestima u slučajevima iznenadne smrti te tako pomoći u pronalasku uzroka smrti. Također, može koristiti za pronalazak genetičkih varijanti uključenih u metabolizam lijekova te pomoći pri istragama slučajeva predoziranja (13). Kao područja potencijalne primjene spominju se još i analiza životinjske i biljne DNA u određivanju vrsta koje su od interesa u raznim forenzičnim istragama, zatim analiza epigenetičkih biljega kao što su npr. oni koji mogu biti korišteni za predviđanje vrste tkiva ili određivanje starosti donora DNA. Spominje se i analiza

mikroRNA, malih molekula koje su podobne za forenzičnu identifikaciju tjelesnih tekućina, identifikaciju vrsta i analizu postmortem intervala (10).

Još jedno zanimljivo područje je i razlikovanje jednojajčanih blizanaca. Smatra se da su jednojajčani blizanci genetički identični. Ipak, poznato je kako se kod svakog od blizanaca jave određene mutacije na različitim mjestima. Prema tome, usporedbom njihovih genoma i pronalaskom ovih razlika trebalo bi biti moguće razlikovanje jednojajčanih blizanaca. Međutim, koristeći standardne metode analize DNA pronalazak tih rijetkih nekoliko razlika u genomu među milijardama identičnih mjesta nije moguće (41). 2014. godine Weber-Lehmann i suradnici opisali su kako je identifikacijom tih rijetkih mutacija NGS-om moguće razlikovanje između jednojajčanih blizanaca. Sekvencirali su DNA iz uzoraka sperme dvojice blizanaca i DNA iz uzorka krvi djeteta jednog od blizanaca. Analizom bionformatičkim alatima otkrili su postojanje pet SNP-ova kod jednog od blizanaca i njegovog djeteta, ali ne i kod drugog blizanca. Ovi rezultati otvaraju nove mogućnosti u rješavanju do sada nerješivih slučajeva očinstva ili kaznenih slučajeva koji uključuju jednojajčane blizance (42).

2.3.8. Potencijalni problemi primjene MPS-a u forenzici

Jasne su potencijalne prednosti korištenja MPS-a za forenzične analize. Ipak, prije potpune inkorporacije u svakodnevni rad pred strukom u budućnosti leže mnogobrojni izazovi. U Europi je 2017. provedeno jedno istraživanje o forenzičnoj primjeni masovnog paralelnog sekvenciranja koje je uključivalo 33 laboratorija iz 25 zemalja. Istraživanje je pokazalo da je 17 laboratorija kupilo bar jedan MPS instrument, a najčešći razlozi ne kupnje uključivali su nedostatak sredstava, općenitu cijenu MPS-a i oklijevanje u korištenju dok se primjene MPS-a ne razviju u potpunosti. Preferirani instrumenti bili su oni tvrtki Illumina (MiSeq, NextSeq) i Thermo Fisher Scientific (Ion Torrent PGM, S5) te su se laboratoriji u analizi uglavnom služili i njihovim softverima. Na pitanje o glavnim izazovima implementacije MPS-a u forenzici najčešći razlozi su uključivali nedostatak konzistentne nomenklature i standarda izvješćivanja, nedostatak kompatibilnosti s postojećim nacionalnim bazama podataka, nedostatak populacijskih podataka za statističke izračune i nedostatak adekvatnog zakonodavnog okvira (43).

Prilikom razgovora o široj primjeni MPS-a u forenzici treba razmotriti i vrstu podataka koja se takvim analizama dobiva i mogućnost prezentiranja takvih podataka na sudu. Kada je riječ

o standardnoj analizi STR-ova kapilarnom elektroforezom rezultati su sadržani u vrlo jednostavnoj podatkovnoj datoteci koja sadržava ime STR lokusa, duljine alela i intenzitet fluorescencije tj. visinu pikova te je takve rezultate lako vizualno predočiti. S druge strane, MPS analizom dobiju se milijuni očitanih sekvenci u jednoj analizi te se treba osloniti na posebne softvere koji će prevest ove milijune očitavanja u razumljivi sažetak koji je onda moguće jasno izložiti. Također, ne postoji zlatni standard u smislu korištenja određene MPS platforme ili softvera kao što je to slučaj sa STR analizom kapilarnom elektroforezom. Zbog toga je puno teže uspoređivati rezultate na različitim platformama i između različitih laboratorija. Još jedan problem je i nomenklatura. Da bi se rezultati MPS analize STR-ova preveli u format usporediv s rezultatima analize kapilarnom elektroforezom potrebna su nova, jasna pravila imenovanja. Treba paziti da se prilikom toga ne izgube sve dodatne vrijedne informacije dobivene MPS-om. Posljedično ovome, javlja se problem uključivanja STR profila dobivenih MPS analizom u nacionalne i internacionalne baze podataka. Za STR-profile dobivene kapilarnom elektroforezom postoji univerzalno prihvaćena nomenklatura i multipleksni kitovi koji omogućavaju njihovu jednostavnu pohranu u DNA baze podataka. Kako je već spomenuto, za MPS ne postoji nikakva standardizacija u smislu platformi ili nomenklature. Jasno je kako će za rutinsku primjenu MPS-a u analizi STR-ova biti potrebno razviti razne preporuke i smjernice i riješiti brojne praktične probleme (44). Također, kao jedan od glavnih izazova implementacije MPS-a u rutinski rad spominje se i razvitak alata i softvera za analizu dobivenih podataka sekvenciranja koji su podobni za forenzičnu primjenu. Prije nego što se softveri upotrebe za stvarne slučajeve oni će morati biti pouzdani i u potpunosti validirani (13).

Korištenje novih tehnologija masivnog paralelnog sekvenciranja za sobom povlači razna etička i pravna pitanja. Do sada su u sklopu rutinskih analiza forenzični laboratoriji imali uvid malen broj točno određenih genetičkih biljega, a s brzim razvojem novih tehnologija sada mogu istraživati veći broj genetičkih biljega za predikciju fenotipa, podrijetla i kompletnu analizu mitohondrijskog genoma. U ovakvim analizama forenzičari će u velikoj količini genetičkih podataka možda nenamjerno naići na podatke o npr. mogućim predispozicijama za određene bolesti, te će se u budućnosti morati točno odrediti način postupanja s takvim informacijama. Korisnost predviđanja vanjskih vidljivih karakteristika i biogeografskog podrijetla uvelike će ovisiti o težini koja se takvim dokazima daje i o njihovoj uspješnosti da usmjere istragu u pravom smjeru. Ipak, veći problem tiče se pitanja privatnosti. Neki tvrde da su takve analize velika invazija na privatnost, s druge strane tvrdi se kako su

laboratoriji i do sada imajući pristup nečijem uzorku DNA mogli, ako su htjeli, izvući iz njega svakojake podatke. U nekim zemljama zakonom je definirana forenzična upotreba predviđanja vanjskih vidljivih karakteristika i biogeografskog podrijetla. Tako je u Nizozemskoj dopuštena upotreba fenotipizacije, ali je ograničena na karakteristike kojih je donor traga svjestan, tj. one koje su vidljive od rođenja, a u nekim zemljama je analiza DNA ograničena na ne-kodirajuće biljege. Jasno je da će inkorporacijom ovakvih analiza u svoj rad forenzični laboratoriji trebati razmotriti pitanja poput pristupa informacijama, pohrane i sigurnosti genetskih podataka (45).

3. RAPID DNA TEHNOLOGIJA U FORENZIČNIM ZNANOSTIMA

Predviđa se kako će u budućnosti forenzična DNA analiza postati informativnija, osjetljivija i brža. Upravo je skraćivanje vremena DNA analize ono na čemu se posljednjih godina mnogo radilo. Predstavljeni su takozvani *rapid DNA* instrumenti koji uključuju sve korake DNA analize, ali gotovi DNA profil generiraju mnogo brže nego standardnom analizom (46). *Rapid DNA* tehnika podrazumijeva potpuno automatizirani, *hands-free* proces dobivanja STR profila iz referentnog uzorka bukalne sluznice u relativno kratkom vremenu. U procesu se standardni koraci DNA analize poput izdvajanja, umnažanja, odvajanja, otkrivanja i određivanja alela odvijaju potpuno automatizirano i bez ljudske intervencije (47).

3.1. Primjena rapid DNA tehnologije

Rapid DNA instrumenti u policijskim stanicama omogućili bi brzo dobivanje DNA profila od osumnjičenika ili uhićenika te njihovu usporedbu sa profilima iz nacionalnih baza podataka. Na taj način bi se DNA profil uhićenika uspio obraditi i usporediti s bazom podataka dok je istoga još uvijek moguće držati u pritvoru. S druge strane standardnim postupkom potrebno je prvo uzorak dostaviti u laboratorij, zatim slijedi relativno dugotrajna standardna analiza, za to vrijeme je osumnjičenik vjerojatno već pušten iz pritvora. Primjena ovakvih instrumenata bila bi korisna i na graničnim prijelazima u slučajevima ilegalne imigracije za brzo utvrđivanje identiteta zadržanih osoba. *Rapid DNA* tehnologija mogla bi svoju uporabu pronaći i u slučajevima vojnih sukoba u svrhu identifikacije žrtava, neprijatelja, razlikovanja neprijatelja od suboraca, dopuštanju prolaska kroz vojne kontrolne točke ili pripisivanju streljiva i oružja neprijatelju. Standardna DNA analiza koja zahtjeva visoko kvalificirano osoblje, kontrolirane laboratorijske uvjete, posebne instrumente i duži period vremena bila bi u tim slučajevima od male koristi. Takva dugotrajna procedura stoji na putu donošenja brzih odluka koje su nužne u ovakvim scenarijima (47-49).

Potencijalna primjena ovakvih sustava moguća je i u slučajevima masovnih katastrofa. Identifikacija osoba u slučajevima masovnih katastrofa može potrajati tjednima ili mjesecima. Upotreba ovakvih sustava na mjestu katastrofe omogućila bi brzu identifikaciju žrtava u

bolnicama ili skloništima, pomogla stvaranju popisa nestalih i pronađenih te pružila obiteljima bitne informacije o sudbini njihovih najmilijih (50).

Primjena *rapid DNA* analize potencijalno je od velike koristi i u slučajevima trgovine ljudima. Trgovina ljudima radi prisilnog rada ili spolnog ropstva, trgovina ljudskim organima i nezakonita posvajanja globalni su problemi ogromnih razmjera (51). Primjena analize DNA i razvikanje baza podataka kod trgovanja ljudima pružaju mogućnost identifikacije žrtava, spajanja obitelji i hvatanja počinitelja. Analiza DNA može biti od velike pomoći u rješavanju presudnih pitanja u slučajevima trgovine ljudima, a razvojem *rapid DNA* tehnologije to je moguće napraviti za znatno kraće vrijeme, bez potrebe za obučanim osobljem i izvan laboratorija i to često u izazovnim okruženjima i okolnostima koja su česta u slučajevima trgovine ljudima. U svom istraživanju Palmbach i suradnici testirali su uzorke brisa bukalne sluznice žrtava trgovine ljudima i briseve predmeta kao što su boce, opušci cigareta, kondomi i slamke, nađene na mjestima pod istragom. Te uzorke su u tajnom zadatku prikupili istražitelji u ustanovama za koje se znalo ili sumnjalo da se u njima nalaze žrtve trgovine ljudima koje se seksualno iskorištavaju. *Rapid DNA* analiza provedena je koristeći ANDE™ Rapid DNA System. Od 50 prikupljenih uzoraka, njih 19 je bilo briseva bukalne sluznice žrtava te je njih 18 rezultiralo punim STR profilom, a 1 djelomičnim. Od ostatka briseva uzetih sa raznih predmeta u 71% slučajeva dobiveni su profili, a od toga u 23% puni profili, 42% djelomični i 6% miješani. Jasno je koliko je *rapid DNA* analiza vrijedna u slučajevima istraživanja trgovine ljudima. Ona pruža mogućnost uspješne analize u ovakvim izazovnim okolnostima, bez potrebe za laboratorijskim osobljem i infrastrukturom, a sve to skraćujući potrebno vrijeme analize, a vrijeme je ovdje od presudne važnosti (52).

Što se tiče analize uzoraka s mjesta događaja, primjena *rapid DNA* sustava smanjila bi ukupno vrijeme obrade i brzo pružila vrijedne informacije za nastavak istrage time potencijalno dovela do bržeg hvatanja počinitelja ili razrješenja slučaja. S druge strane, u obzir treba uzeti i činjenicu kako je osjetljivost ovih instrumenata manja od standardne laboratorijske analize. Također, uporabom ovih instrumenata koji konzumiraju dio uzorka, riskira se gubitak uzorka koji bi možda rezultirao profilom u standardnoj laboratorijskoj analizi. Jasno je kako će se prije primjene *rapid DNA* tehnologija u sadašnjem izdanju u analizi uzoraka s mjesta događaja trebati izvagati potencijalna korist naprema šteti. Trebat će se odlučiti između dobivanja brzih rezultata s manje osjetljivom tehnologijom ili pouzdanijih rezultata, ali s gubitkom vremena. Naravno da se očekuje napredak ovih tehnologija, ali se ne očekuje da će u dogledno vrijeme dostići osjetljivost laboratorijske analize (53).

3.2. Sustavi za rapid DNA analizu

Sustavi za *rapid DNA* analizu koriste mikrofluidičke tehnike za izdvajanje DNA, umnažanje i detekciju integrirane u jednom uređaju (51). Primjeri ovakvih potpuno integriranih rapid DNA sustava su ANDE™ sustav i RapidHIT® ID sustav.

3.2.1. ANDE™ sustav

ANDE 4C sustav prvi je *rapid DNA* sustav koji je primio NDIS (*National DNA Index System*) odobrenje od FBI-a čime je odobreno njegovo korištenje za brzu analizu u akreditiranim laboratorijima i izvan laboratorijskih uvjeta sa neobučanim osobljem (54). ANDE 4C instrument izvršava lasersku detekciju 4 fluorescentne boje i kompatibilan je sa PowerPlex 16 sustavom. Kako je FBI ubrzo proširio svoj set CODIS lokusa sa 13 na 20, a isti trend proširenja slijede i ostale svjetske DNA baze podataka, ubrzo je razvijen i prošireni FlexPlex27 multipleks test za analizu 27 lokusa te ANDE 6C sistem koji omogućava detekciju 6 fluorescentnih boja (55). ANDE Rapid DNA Identification System se sastoji od ANDE štapića za uzimanje uzorka, A-čipa za procesuiranje uzoraka i ANDE instrumenta (slika 12). A-čip za jednokratnu upotrebu u sebi sadrži sve potrebe reagense i materijale za potpuno automatiziranu analizu. Ovakav zatvoreni dizajn gdje nema izravnog kontakta između instrumenta i uzoraka ili reagensa smanjuje mogućnost kontaminacije. ANDE instrument se sastoji od više podsustava zaduženih za određene korake u analizi. Unutar ANDE sustava uključeni su i softverski paketi za kontrolu instrumenta, prikupljanje podataka i interpretaciju STR profila. A-čip koji sadrži uzorak brisa umetne se u instrument i automatski započinje obrada uzorka. Slijedi elektroforetsko razdvajanje i laserska detekcija amplificiranih STR fragmenata te softverska analiza. Expert System softver nakon završene analize automatski kreće u obradu podataka. On koristi niz pravila za interpretaciju DNA profila i bez ljudske intervencije obrađuje i označava alele te je DNA profil dostupan za otprilike 90 minuta. U nedavnoj razvojnoj validacijskoj studiji u šest forenzičnih i istraživačkih laboratorija procjenjivan ANDE sustav s FlexPlex testom. Analizirano je preko 2000 uzoraka briseva bukalne sluznice na 13 različitih ANDE instrumenata u različitim laboratorijima. Pokazano je kako ANDE sustav pruža pouzdane, visokokvalitetne rezultate te pokazuje reproducibilnost na različitim instrumentima sa različitim operatorima (54).



Slika 12. ANDE *rapid DNA* instrument (56)

4. lipnja 2018. godine ovaj ANDE sustav je dobio NDIS (*National DNA Index System*) odobrenje od FBI-a čime se dopušta upotreba ovog sustava u akreditiranim laboratorijima i pretraga rezultata u CODIS-u. Prvi je sustav koji je primio odobrenje prema novim standardima koje zahtjeva „*Rapid DNA Act of 2017*“ (56).

3.2.2. Razvoj rapid DNA tehnologije pri FBI-u

FBI (*Federal Bureau of Investigation*) aktivno radi na integraciji *rapid DNA* tehnologija u policijske stanice te je još 2010. godine osnovao „*Rapid DNA Program Office*“ koji radi u suradnji s brojnim ustanovama kako bi omogućio lakši razvoj i integraciju *rapid DNA* tehnologija u ustanovama za provedbu zakona. Bitan korak dogodio se 18. kolovoza 2017. kada je potpisan tzv. „*Rapid DNA Act of 2017*“ koji traži od FBI-a razvitak standarda i procedura za korištenje *rapid DNA* instrumenata i za analizu. Takvi instrumenti biti će implementirani u policijske postaje i akreditirane forenzične laboratorije za analizu referentnih uzoraka. Kao što je već rečeno ANDE 6C Rapid sustav sa FlexPlex27 kitom za analizu ima NDIS odobrenje za uporabu u akreditiranim laboratorijima za analizu i

pretraživanje rezultata poznatih referentnih uzoraka bukalne DNA, dok trenutno ne postoji *rapid DNA* sustav koji ima NDIS odobrenje za korištenje u ustanovama za provedbu zakona u procesu uhićenja. FBI je stoga u procesu razvijanja standarda i procedura za njihovo korištenje i u ovim okolnostima. Za 2019. godinu FBI planira pilot testiranje s odabranim ustanovama za provedbu zakona na saveznoj, državnoj i lokalnoj razini tijekom kojeg će testirati učitavanje i pretraživanje rezultata *rapid DNA* analize uhićenika u CODIS-u. FBI u ovom trenutku ne dopušta analizu forenzičnih uzoraka s mjesta događaja na *rapid DNA* sustavima. Za razliku od uzoraka brisa bukalne sluznice koji su idealni za analizu na ovakvim instrumentima, uzorci s mjesta događaja variraju u kvaliteti, količini te su često miješani. Iz tih razloga, FBI napominje, kako postoje još brojni problemi koje treba riješiti prije uporabe *rapid DNA* sustava u analizi uzoraka s mjesta događaja (57).

3.2.3. RapidHit® ID sustav

IntegenX RapidHIT ID sustav potpuno je automatizirani sustav koji analizira uzorak i generira STR profile podudarne s CODIS-om u manje od 90 minuta (slika 13). Taj je sustav razvijen za upotrebu u decentraliziranom okruženju poput graničnih prijelaza, manjih laboratorija i istražnih pritvora. Sustav koristi kazetu za jednokratnu upotrebu za svaki pojedini uzorak. Kazeta upotrebljava multipleksne kitove GlobalFiler Express ili AmpFLSTR NGMSElect. Također, postoji i primarna kazeta u kojoj su pohranjeni reagensi i modul za kapilarnu elektroforezu te je ova kazeta namijenjena za uporabu 150 puta. Kada je analizom dobiven STR profil, podatke obrađuje RapidLINK softver. Softver omogućava i ručni pregled profila i kontrolu ostalih RapidHIT ID sustava na drugim lokacijama (58).

RapidHIT ID dizajniran je kako bi koristio kazetu za obradu uzorka brisa bukalne sluznice, ali je nedavno razvijena drugačija vrste kazete za uzorak namijenjena obradi DNA iz uzoraka s mjesta događaja. Kada iz uzorka laboratorijsko osoblje izolira DNA, kvantificira i po potrebi prorijedi, uzorak se pipetira u kazetu i kazeta se ubacuje u instrument. Kazeta može koristiti iste već spomenute multipleksne kitove, a amplifikacija, elektroforeza i analiza produkata se odvijaju unutar RapidHIT ID sustava. Nakon ubacivanja gotovi STR profil dobiva se za manje od 90 minuta. Ovakvo pojednostavljenje i integracija rutinskih koraka analize PCR amplifikacije i elektroforeze, koje se velikim dijelom izvode ručno, ubrzava ukupno vrijeme analize i smanjuje rizik od kontaminacije od strane osoblja. U isto vrijeme se poštuju

standardi kvalitete FBI-a koji nalažu da se za uvrštavanje u bazu podataka kao ključan korak za određivanje kvalitete uzorka s mjesta događaja mora kvantificirati DNA (59).



Slika 13. RapidHIT ID System (58)

4. ZAKLJUČAK

Forenzična DNA analiza zauzima ključno mjesto u identifikaciji osoba u slučajevima policijskih istraga, nestalih osoba i masovnih katastrofa te se još od svojih početaka nametnula kao nezamjenjiv alat u svim forenzičnim istragama. Kao i sva ostala područja znanosti i forenzična DNA analiza razvija se i konstantno napreduje. Razvitak je vidljiv u neprestanom predstavljanju novih tehnologija, usavršavanju instrumentacije te bržim i osjetljivijim metodama. Nove tehnologije uspješno rješavaju neke od glavnih problema s kojima se forenzična DNA analiza do tada suočavala, a dobar primjer toga je i masovno paralelno sekvenciranje. Smatra se da će daljnjim razvitkom MPS tehnologija biti moguće sekvencirati razne izazovne uzorke i iz njih dobiti tražene podatke. Zbog toga će ove tehnologije biti ključne u analizi uzoraka koji su do sada predstavljali veliki problem zbog svoje loše kvalitete ili male količine poput npr. degradiranih uzoraka ili mješavina. Također, mogućnost ujedinjenja većeg broja genetičkih biljega i istovremene analize autosomnih biljega, mitohondrijske DNA te biljega spolnih kromosoma pružit će veliku količinu vrijednih informacija u kratko vrijeme. Također, uključivanje SNP-ova za predikciju fenotipskih karakteristika i geografskog podrijetla u te testove pružit će sasvim novi uvid u karakteristike osobe od koje trag potječe i otvoriti nove mogućnosti u istrazi. Nove vidike u području forenzičnih znanosti otvara i mogućnost forenzične analize mikrobioma u svrhu identifikacije osoba. Masivno paralelno sekvenciranje bi, osim na polju analize mikrobioma, moglo imati značajnu ulogu i u analizi biljne i životinjske DNA u forenzičnim istragama. Osim poboljšanja u kvaliteti dobivenih informacija, ove tehnologije pružaju poboljšanje u smislu mogućnosti analize većeg broja uzoraka. S druge strane, kada se govori o brzini forenzične DNA analize, *rapid DNA* tehnologije brzim dobivanjem genetičkog profila pružaju mogućnost bržeg hvatanja počinitelja ili razrješenja slučaja. Također, korisnima bi se pokazale i u uvjetima izvan laboratorija. Tako bi na mjestima poput policijskih stanica, graničnih prijelaza te u scenarijima poput trgovine ljudima, masovnih katastrofa ili rata, ove tehnologije omogućile brzo dobivanje informacija. U ovakvim uvjetima u kojima je vrijeme presudno, takve informacije dovele bi do bržeg donošenja ispravnih odluka.

Iako je vidljiv veliki potencijal primjene masivnog paralelnog sekvenciranja i *rapid DNA* tehnologija u forenzičnim znanostima, također je jasno kako se na putu do punog ostvarivanja tog potencijala nalaze određeni problemi te su potrebna daljnja poboljšanja i usavršavanja. Izgledno je kako će MPS imati značajnu ulogu na području forenzične analize DNA, a do

potpunog uključivanja u rutinski rad forenzičnog laboratorija trebat će riješiti određene probleme kako bi takve tehnologije zadovoljile standarde struke, uzimajući u obzir njihovu korist naprema cijeni. S druge strane, ravnoteža između brzine i osjetljivosti tj. kvalitete podataka odigrat će bitnu ulogu u primjeni i razvitku *rapid DNA* tehnologija. Za upotrebu obje spomenute tehnologije u forenzici važnu ulogu odigrat će i standardizacija, validacijski procesi, zakonska uređenja te suradnja unutar znanstvene zajednice. Naposljetku, jasno je kako naporima istraživača i cijele znanstvene zajednice ove tehnologije i dalje napreduju, a njihova potencijalna korist u forenzičnim znanostima sve je izglednija i očitija.

5. LITERATURA

1. Primorac D, Schanfield M, Marjanović D. Osnove genetike i humane genske varijacije. U: Primorac D, Schanfield M. Forenzična analiza DNA: Interdisciplinarni pristup. Školska knjiga. Zagreb, 2016.
2. Primorac D. Marjanović D. Analiza DNA u sudskoj medicini i u pravosuđu. U: Primorac D. i suradnici. Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Medicinska naklada Zagreb. 2008.
3. Marjanović D, Primorac D. Varijabilnost DNK i molekularni markeri u forenzičnoj genetici. U: Marjanović D. Primorac D. Forenzična genetika: teorija i aplikacija. Naučna i stručna knjiga „Lelo“. Sarajevo, 2013.
4. Single nucleotide polymorphisms and applications. In: Butler JM. Advanced topics in forensic DNA typing: methodology. Academic Press; 2011.
5. Marjanović D, Primorac D. Primjena analize Lineage markera i X kromosoma u forenzičnoj genetici. U: Marjanović D. Primorac D. Forenzična genetika: teorija i aplikacija. Naučna i stručna knjiga „Lelo“. Sarajevo, 2013.
6. Holland M.M, Lauc G. Forenzična analiza mitohondrijskih molekula DNA (mtDNA). U: Primorac D, Schanfield M. Forenzična analiza DNA: Interdisciplinarni pristup. Školska knjiga. Zagreb, 2016.
7. Marjanović D. Primorac D. Osnovni modeli i faze procesa DNK analize. U: Marjanović D. Primorac D. Forenzična genetika: teorija i aplikacija. Naučna i stručna knjiga „Lelo“. Sarajevo, 2013.
8. Marjanović D. Primorac D. Tehnološki razvojni trendovi u forenzičnoj genetici. U: Marjanović D. Primorac D. Forenzična genetika: teorija i aplikacija. Naučna i stručna knjiga „Lelo“. Sarajevo, 2013.
9. Mitochondrial DNA analysis. In: Butler JM. Advanced topics in forensic DNA typing: methodology. Academic Press; 2011
10. Yang Y, Xie B, Yan J. Application of next-generation sequencing technology in forensic science. Genomics, proteomics & bioinformatics, 2014, 12.5: 190-197.
11. Ansorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques. New biotechnology, 2009, 25.4: 195-203.
12. Alvarez-Cubero MJ, et al. Next generation sequencing: an application in forensic sciences?. Annals of human biology, 2017, 44.7: 581-592.

13. Børsting C, Morling N. Next generation sequencing and its applications in forensic genetics. *Forensic Science International: Genetics*, 2015, 18: 78-89.
14. Goodwin S, McPherson, JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 2016, 17.6: 333.
15. Liu L, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *BioMed Research International*, 2012, 2012.
16. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, 2008, 26.10: 1135.
17. Kim EH, et al. Massively parallel sequencing of 17 commonly used forensic autosomal STRs and amelogenin with small amplicons. *Forensic Science International: Genetics*, 2016, 22: 1-7.
18. Van Neste C, Van Nieuwerburgh F, Van Hoofstat D, Deforce D. Forensic STR analysis using massive parallel sequencing. *Forensic Science International: Genetics*, 2012, 6.6: 810-818.
19. Rockenbauer E, Hansen S, Miikkelsen M. Børsting C, Morling N. Characterization of mutations and sequence variants in the D21S11 locus by next generation sequencing. *Forensic Science International: Genetics*, 2014, 8.1: 68-72.
20. Dalsgaard S, et al. Characterization of mutations and sequence variations in complex STR loci by second generation sequencing. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2013, 4.1: e218-e219.
21. Van Neste C, Vandewoestyne M, Van Criekinge W, Deforce D, Van Nieuwerburgh F. My-Forensic-Loci-queries (MyFLq) framework for analysis of forensic STR data generated by massive parallel sequencing. *Forensic Science International: Genetics*, 2014, 9: 1-8.
22. Fordyce SL, et al. Second-generation sequencing of forensic STRs using the Ion Torrent™ HID STR 10-plex and the Ion PGM™. *Forensic Science International: Genetics*, 2015, 14: 132-140.
23. Zeng X, et al. High sensitivity multiplex short tandem repeat loci analyses with massively parallel sequencing. *Forensic Science International: Genetics*, 2015, 16: 38-47.
24. Seo SB, et al. Single nucleotide polymorphism typing with massively parallel sequencing for human identification. *International journal of legal medicine*, 2013, 127.6: 1079-1086.

25. Kayser M, De Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nature Reviews Genetics*, 2011, 12.3: 179.
26. Gettings KB, Kiesler KM, Vallone PM. Performance of a next generation sequencing SNP assay on degraded DNA. *Forensic Science International: Genetics*, 2015, 19: 1-9.
27. Irwin J, Just R, Scheible M, Loreille O. Assessing the potential of next generation sequencing technologies for missing persons identification efforts. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2011, 3.1: e447-e448.
28. Caratti S, Turrina S, Ferriani M, Cosentino E, De Leo D. MiSeq FGx sequencing system: a new platform for forensic genetics. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2015, 5: e98-e100.
29. Calafell F, et al. An assessment of a massively parallel sequencing approach for the identification of individuals from mass graves of the Spanish Civil War (1936–1939). *Electrophoresis*, 2016, 37.21: 2841-2847.
30. Parson W, et al. Evaluation of next generation mtGenome sequencing using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM). *Forensic Science International: Genetics*, 2013, 7.5: 543-549.
31. Templeton JEL, et al. DNA capture and next-generation sequencing can recover whole mitochondrial genomes from highly degraded samples for human identification. *Investigative genetics*, 2013, 4.1: 26.
32. Calloway CD, Erlich H. Razvoj novih tehnika u forenzičnoj analizi DNA. U: Primorac D, Schanfield M. *Forenzična analiza DNA: Interdisciplinarni pristup*. Školska knjiga. Zagreb, 2016.
33. McElhove J, et al. Development and assessment of an optimized next-generation DNA sequencing approach for the mtgenome using the Illumina MiSeq. *Forensic Science International: Genetics*, 2014, 13: 20-29.
34. Schmedes SE, Sajantila A, Budowle B. Expansion of microbial forensics. *Journal of clinical microbiology*, 2016, 54.8: 1964-1974.
35. Clarke TH, Gomez A, Singh H, Nelson KE, Brnkac LM. Integrating the microbiome as a resource in the forensics toolkit. *Forensic Science International: Genetics*, 2017, 30: 141-147.
36. Schmedes SE, Woerner AE, Budowle B. Forensic human identification using skin microbiomes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2017, 83.22: e01672-17.
37. Hampton-Marcell JT, Lopez JV, Gilbert JA. The human microbiome: an emerging tool in forensics. *Microbial biotechnology*, 2017, 10.2: 228.

38. Kuiper I. Microbial forensics: next-generation sequencing as catalyst: The use of new sequencing technologies to analyze whole microbial communities could become a powerful tool for forensic and criminal investigations. *EMBO reports*, 2016, 17.8: 1085-1087.
39. Wurmbach E. Predviđanje tjelesnih obilježja, kao što su boja očiju, kose i kože, isključivo uz pomoć DNA analiza. U: Primorac D, Schanfield M. Forenzična analiza DNA: Interdisciplinarni pristup. Školska knjiga. Zagreb, 2016.
40. Kayser M. Forensic DNA phenotyping: predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Science International: Genetics*, 2015, 18: 33-48.
41. Budowle B, Schmedes SE, Wendt FR. Increasing the reach of forensic genetics with massively parallel sequencing. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, 2017, 13.3: 342-349.
42. Weber-Lehmann J. et al. Finding the needle in the haystack: differentiating “identical” twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. *Forensic Science International: Genetics*, 2014, 9: 42-46.
43. Alonso A, et al. European survey on forensic applications of massively parallel sequencing. *Forensic Science International: Genetics*, 2017, 29: e23-e25.
44. De Knijff P. From next generation sequencing to now generation sequencing in forensics. *Forensic Science International: Genetics*, 2019, 38: 175-180.
45. Scudder N, McNevin D, Kelty SF, Walsh SJ, Robertson J. Massively parallel sequencing and the emergence of forensic genomics: Defining the policy and legal issues for law enforcement. *Science & Justice*, 2018, 58.2: 153-158.
46. Butler JM. The future of forensic DNA analysis. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences*, 2015, 370.1674: 20140252.
47. Asplen C. DNA baze podataka. U: Primorac D, Schanfield M. Forenzična analiza DNA: Interdisciplinarni pristup. Školska knjiga. Zagreb, 2016.
48. Hopwood AJ, et al. Integrated microfluidic system for rapid forensic DNA analysis: sample collection to DNA profile. *Analytical chemistry*, 2010, 82.16: 6991-6999.
49. Tan E, et al. Fully integrated, fully automated generation of short tandem repeat profiles. *Investigative genetics*, 2013, 4.1: 16.
50. <https://www.ande.com/government-and-immigration/> 1.4.2019.

51. Katsanis SH, Kim J. DNA u ilegalnoj imigraciji i trgovanju ljudima. U: Primorac D, Schanfield M. Forenzična analiza DNA: Interdisciplinarni pristup. Školska knjiga. Zagreb, 2016.
52. Palmbach T, Blom J, Hoynes E, Primorac D, Gaboury M. Utilizing DNA analysis to combat the world wide plague of present day slavery–trafficking in persons. Croatian medical journal, 2014, 55.1: 3-9.
53. Mapes AA, Stoel RD, De Poot CJ, Vergeer P, Huyck M. Decision support for using mobile Rapid DNA analysis at the crime scene. Science & Justice, 2019, 59.1: 29-45.
54. Carney C, et al. Developmental validation of the ANDE™ rapid DNA system with FlexPlex™ assay for arrestee and reference buccal swab processing and database searching. Forensic Science International: Genetics, 2019, 40: 120-130.
55. Grover R, et al. FlexPlex27—highly multiplexed rapid DNA identification for law enforcement, kinship, and military applications. International journal of legal medicine, 2017, 131.6: 1489-1501.
56. <https://www.ande.com/what-is-rapid-dna/> 1.4.2019.
57. <https://www.fbi.gov/services/laboratory/biometric-analysis/codis/rapid-dna#Rapid-DNA%20in%20Booking%20Station> 1.4.2019.
58. Salceda S, et al. Validation of a rapid DNA process with the RapidHIT® ID system using GlobalFiler® Express chemistry, a platform optimized for decentralized testing environments. Forensic Science International: Genetics, 2017, 28: 21-34.
59. Buscaino J, et al. Evaluation of a rapid DNA process with the RapidHIT® ID system using a specialized cartridge for extracted and quantified human DNA. Forensic Science International: Genetics, 2018, 34: 116-127.

6. SAŽETCI

6.1. Sažetak

Primjena novih tehnologija u forenzičnoj genetici

Stalni napredak u području analize DNA dovodi do razvitka novih metoda i tehnologija koje svoju primjenu zatim pronalaze i u području forenzičnih znanosti. Ovaj rad predstavlja kratki pregled tehnologija masivnog paralelnog sekvenciranja i *rapid DNA* analize te njihove primjene u forenzici. Potencijal primjene metoda masivnog paralelnog sekvenciranja vidljiv je u analizi izazovnih uzoraka, poput degradiranih uzoraka ili mješavina, te mogućnosti simultane analize autosomnih biljega, mitohondrijske DNA i spolnih kromosoma u jedinstvenom testu. Također, metode masivnog paralelnog sekvenciranja korisne su u analizi SNP-ova za predikciju fenotipskih karakteristika i u analizi mikrobioma te potencijalno otvaraju nove mogućnosti u forenzičnim istragama i forenzičnoj identifikaciji osoba. S druge strane, metode *rapid DNA* analize pružaju poboljšanje u smislu brzine dobivanja genetičkog profila. Potencijalnu primjenu imaju i izvan laboratorija na mjestima poput policijskih stanica, graničnih prijelaza te u scenarijima poput trgovine ljudima ili masovnih katastrofa. Iako je potencijal primjene ovih metoda u forenzičnim znanostima itekako vidljiv, prije njihovog uključivanja u rutinski rad potrebno je uzeti u obzir brojne čimbenike i prevladati određene izazove kako bi se zadovoljili standardi struke.

Ključne riječi: DNA analiza, forenzika, masivno paralelno sekvenciranje, rapid DNA

6.2. Abstract

Application of new technologies in forensic genetics

Constant progress in the field of DNA analysis leads to the development of new methods and technologies that consequently find their application in the field of forensic science. This paper presents a brief overview of massively parallel sequencing technologies and rapid DNA analysis and their application in forensics. The potential of applying massively parallel sequencing methods is seen in the analysis of challenging samples, such as degraded samples or mixtures, and the ability to simultaneously analyze autosomal markers, mitochondrial DNA and sex chromosome markers in a single test. Also, methods of massively parallel sequencing are useful in SNP analysis for predicting phenotypic characteristics and in microbiome analysis and thus potentially opening up new possibilities in forensic investigations and forensic human identification. On the other hand, rapid DNA analysis provides an improvement in terms of the speed of obtaining a genetic profile. Rapid DNA analysis could also potentially be useful outside laboratories at places like police stations, border crossings, and in scenarios such as human trafficking or mass disasters. Although the potential of using these methods in forensic science is evident, before their implementation in routine forensic work it is necessary to consider numerous factors and overcome many challenges in order for them to meet the standards of the profession.

Key words: DNA analysis, forensic science, massively parallel sequencing, rapid DNA

7. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Antonia Zečić

Datum i mjesto rođenja: 6. studenog 1994., Split

Adresa: Dobrilina 6, 21 000 Split

Kontakt: antoniazecic@gmail.com, +385917863376

Obrazovanje:

2001. - 2009. Osnovna škola „Split 3“, Split

2009. - 2013. V. gimnazija „Vladimir Nazor“ Split

2013. - 2016. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Split

2016. - 2019. Sveučilišni odjel za forenzične znanosti, Forenzična kemija i molekularna biologija, Split

8. IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, Antonia Zečić izjavljujem da je moj diplomski rad pod naslovom „Primjena novih tehnologija u forenzičnoj genetici“ 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, _____

Potpis studenta/studentice: _____