

Pripevek je bil prvič objavljen leta 2000, v zborniku z naslovom *Brez milosti: ranjeni, invalidni in bolni* povojni ujetniki na Slovenskem, katerega urednik je bil dr. Lovor Šturm. Predlog navedbe:

Drobnič, K. (2000). Identifikacija pogrešanih oseb iz množičnih grobišč s preiskavo jedrne in mitohondrijske DNK.

V L. Šturm (ur.), *Brez milosti: ranjeni, invalidni in bolni povojni ujetniki na Slovenskem* (str. 351–369). Ljubljana: Nova revija

Identifikacija pogrešanih oseb iz množičnih grobišč s preiskavo jedrne in mitohondrijske DNK

Katja Drobníč

Uvod

Pomembnost preiskav DNK na področju prepoznavanja oseb in ugotavljanja sorodstvenih povezav narašča skupaj z razvojem znanstvene tehnologije. Zelo odmevna primera, izvedena s pomočjo analiz DNK, kot je prepoznavanje kosti, ki so jih leta 1991 izkopali v Rusiji kot posmrtno ostanke pomorjene cesarske družine Romanov (1, 2, 3) in prepoznavo neznanega ameriškega vojaka, padlega v vietnamski vojni, ki so ga davnega leta 1984 pokopali v marmornato grobnico na narodnem pokopališču v Virginiji (ZDA), kot Michaela J. Blassie (4), sta zbudili splošno zanimanje za preiskave DNK. Najbolj uveljavljeni in najbolj zanesljivi metodi, ki se danes na tem področju uporabljata, sta določanje alelnih vzorcev (profilov DNK) jedrne DNK in določanje nukleotidnega zaporedja mitohondrijske DNK (mtDNK). Znanost in tehnika sta na tem področju tako napredovali, da je danes mogoče ugotoviti identiteto zelo starega okostja z zelo visoko stopnjo verjetnosti (5). Čeprav obstajajo še druge identifikacijske serološke metode, katerih identifikacija temelji na določanju proteinskega polimorfizma ali krvnih skupin, ostaja preiskava DNK kot najbolj učinkovita in robustna metoda, vse od odkritja prstnih odtisov. Za identifikacijo pogrešane osebe z najnovejšo metodo preiskave DNK, ki temelji na analizi polimorfnih področij DNK ob uporabi izredno občutljive metode pomnoževanja DNK, imenovana PCR (angleško *polymerase chain reaction* – verižna reakcija s polimerazo), je dovolj že del skeleta (6).

Zaradi izredne učinkovitosti preiskav DNK se le-te vedno bolj uveljavljajo tudi na področju prepoznavanja oseb in ugotavljanja sorodstvenih povezav okostij, najdenih v različnih množičnih grobiščih. Običajno se pozitivna identifikacija okostij opravlja s primerjalno analizo zobnih in drugih zdravniških izvidov (npr. rentgenske slike) z ustreznimi opažanji, vidnimi na okostju (7). Če od smrti žrtev še ni minilo mnogo časa, se lahko te preiskave nadomesti tudi z opisom obleke ali osebnih predmetov, za katere se ve, da jih je pogrešani nosil pred izginotjem (8). V večini primerov pa preteče od smrti žrtve do najdbe okostja veliko časa, ko ni več na voljo rentgenskih slik ali zobnega statusa pogrešanih. Druga značilnost množičnih pobojev, zlasti civilnega prebivalstva, pa je tudi, da morajo žrtve v mnogih primerih pred usmrtnitvijo odložiti vse osebne predmete, po katerih bi se jih prepoznalo, včasih pride celo do puljenja zlatih zob (9, 10). Prepoznavna s tradicionalnimi identifikacijskimi metodami in tehnikami (daktiloskopske analize, prepoznavna po predmetih, antropološke in zobne primerjave, radiološke primerjave, metode rekonstrukcije obraza) pa odpove tudi takrat, ko so na voljo le posamezni deli skeleta, okostje otrok, deli okostij z neprepoznavnimi značilnostmi ali ko je v grobišču veliko število oseb s približno enakimi značilnostmi (npr. mladi moški v starosti nabora). V teh primerih lahko omogočajo prepoznavo le preiskave DNK. Danes obstaja že mnogo skupin, ki so uspešno izvedle forenzično DNK identifikacijo skeletnih ostankov z analizo jedrnih (1, 11, 12, 13, 14) in mitohondrijskih označevalcev (1–4, 8, 9, 15, 16, 17). Analiza mtDNK ima mnogo prednosti pred običajnimi analizami jedrne DNK, zlasti pri velikih projektih, kot so množična grobišča (18). Ker je mtDNK navzoča v vsaki celici v tisoč kopijah

(19) in je hkrati zaradi svoje strukture bolj odporna na razgradnjo v primerjavi z jedrno DNK, jo je, iz razgrajenih vzorcev (kosti), veliko lažje izolirati v zadostni količini kot jedrno DNK. V nasprotju z jedrno DNK, ki se v enaki količini podeduje od obeh staršev, se mtDNK deduje le po materi (20). Kar pomeni, da je za ugotavljanje sorodstvenih povezav s primerjalno analizo genotipov mtDNK dovolj le primerjava med sorodniki po materi (tako lahko pride v poštev tudi daljno sorodstvo), medtem ko je za analizo jedrne DNK potrebno poznavanje DNK bližnjega sorodstva, kot so starši ali bratje/sestre, če so starši že pokojni (21, 22).

DNK

Splošno

Človeško telo je sestavljeno iz več milijard celic, ki so zelo majhne in jih merimo v tisočinkah milimetra. V centru vsake celice (razen zrelih rdečih krvničk) je jedro, ki uravnava delovanje in razvoj celice. Celično jedro je zelo pomembno, saj vsebuje nitaste strukture, imenovane kromosomi. V njih je molekula z zapletenim imenom deoksiribonukleinska kislina ali krajše DNK.

DNK je zelo dolga molekula, sestavljena iz dveh verig, zavitih druga okoli druge v dvojno spiralo ali vijačnico. DNK je človeški dedni material (človeški genom), v katerem se v besede in stavke povezujejo štirje elementi (nukleotidi), označeni s črkami A, C, G in T. V njih je zapisana vsa razlika med posamezniki, kot so spol, barva las in oči, višina in tako dalje. DNK je torej biokemična osnova vsakega posameznika, brez katere ne bi bilo življenja in raznovrstnosti. Prenaša se s staršev na potomce. Najpomembnejša lastnost dvojne vijačnice je, da prečke, ki povezujejo obe vijačnici, predstavljajo zmeraj isti pari nukleotidov: A se vedno pari s T in narobe, G se vedno pari s C in narobe. Zaporedje nukleotidov vzdolž ene verige določi torej zaporedje vzdolž druge. Ta lastnost omogoča, da se molekula DNK med podvojevanjem odpre kot zadrga in na vsaki od obeh verig dvojne vijačnice nastane nova kopija (23). Zaradi takega načina podvojevanja DNK imajo večinoma vse celice istega organizma enak zapis DNK in zato ni pomembno, katere biološke vzorce posameznika v forenzičnih preiskavah primerjamo med seboj.

Lastnosti jedrne DNK

V človeških telesnih celicah je jedrna DNK razdeljena na 46 kromosomov, ki se jih po velikosti razdeli v 23 parov, kromosoma v paru sta enaka po velikosti in obliki. Izjema sta spolna kromosoma, X in Y, pri katerih je kromosom Y, ki določa moški spol, precej manjši od kromosoma X. Število kromosomov je sodo, ker ga sestavljajo kromosomi obeh staršev, od vsakega od staršev en niz. Zato so tudi dedne zasnove za vsako lastnost dvojne. Bratje in sestre podedujejo od istih staršev drugačno kombinacijo kromosomov in se zato razlikujejo drug od drugega. Izjema so enojajčni dvojčki, ki so v bistvu naravne kopije (kloni) (24, 25).

Uvod

Pomembnost preiskav DNK na področju prepoznavanja oseb in ugotavljanja sorodstvenih povezav narašča skupaj z razvojem znanstvene tehnologije. Zelo odmevna primera, izvedena s pomočjo analiz DNK, kot je prepoznavanje kosti, ki so jih leta 1991 izkopali v Rusiji kot posmrtno ostanke pomorjene cesarske družine Romanov (1, 2, 3) in prepoznavo neznanega ameriškega vojaka, padlega v vietnamski vojni, ki so ga davnega leta 1984 pokopali v marmornato grobnico na narodnem pokopališču v Virginiji (ZDA), kot Michaela J. Blassie (4), sta zbudili splošno zanimanje za preiskave DNK. Najbolj uveljavljeni in najbolj zanesljivi metodi, ki se danes na tem področju uporabljata, sta določanje alelnih vzorcev (profilov DNK) jedrne DNK in določanje nukleotidnega zaporedja mitohondrijske DNK (mtDNK). Znanost in tehnika sta na tem področju tako napredovali, da je danes mogoče ugotoviti identiteto zelo starega okostja z zelo visoko stopnjo verjetnosti (5). Čeprav obstajajo še druge identifikacijske serološke metode, katerih identifikacija temelji na določanju proteinskega polimorfizma ali krvnih skupin, ostaja preiskava DNK kot najbolj učinkovita in robustna metoda, vse od odkritja prstnih odtisov. Za identifikacijo pogrešane osebe z najnovejšo metodo preiskave DNK, ki temelji na analizi polimorfnih področij DNK ob uporabi izredno občutljive metode pomnoževanja DNK, imenovana PCR (angleško *polymerase chain reaction* – verižna reakcija s polimerazo), je dovolj že del skeleta (6).

Zaradi izredne učinkovitosti preiskav DNK se le-te vedno bolj uveljavljajo tudi na področju prepoznavanja oseb in ugotavljanja sorodstvenih povezav okostij, najdenih v različnih množičnih grobiščih. Običajno se pozitivna identifikacija okostij opravlja s primerjalno analizo zobnih in drugih zdravniških izvidov (npr. rentgenske slike) z ustreznimi opažanji, vidnimi na okostju (7). Če od smrti žrtev še ni minilo mnogo časa, se lahko te preiskave nadomesti tudi z opisom obleke ali osebnih predmetov, za katere se ve, da jih je pogrešani nosil pred izginotjem (8). V večini primerov pa preteče od smrti žrtve do najdbe okostja veliko časa, ko ni več na voljo rentgenskih slik ali zobnega statusa pogrešanih. Druga značilnost množičnih pobojev, zlasti civilnega prebivalstva, pa je tudi, da morajo žrtve v mnogih primerih pred usmrtnitvijo odložiti vse osebne predmete, po katerih bi se jih prepoznalo, včasih pride celo do puljenja zlatih zob (9, 10). Prepoznavo s tradicionalnimi identifikacijskimi metodami in tehnikami (daktiloskopske analize, prepoznavo po predmetih, antropološke in zobne primerjave, radiološke primerjave, metode rekonstrukcije obraza) pa odpove tudi takrat, ko so na voljo le posamezni deli skeleta, okostje otrok, deli okostij z neprepoznavnimi značilnostmi ali ko je v grobišču veliko število oseb s približno enakimi značilnostmi (npr. mladi moški v starosti nabora). V teh primerih lahko omogočajo prepoznavo le preiskave DNK. Danes obstaja že mnogo skupin, ki so uspešno izvedle forenzično DNK identifikacijo skeletnih ostankov z analizo jedrnih (1, 11, 12, 13, 14) in mitohondrijskih označevalcev (1–4, 8, 9, 15, 16, 17). Analiza mtDNK ima mnogo prednosti pred običajnimi analizami jedrne DNK, zlasti pri velikih projektih, kot so množična grobišča (18). Ker je mtDNK navzoča v vsaki celici v tisoč kopijah

(19) in je hkrati zaradi svoje strukture bolj odporna na razgradnjo v primerjavi z jedrno DNK, jo je, iz razgrajenih vzorcev (kosti), veliko lažje izolirati v zadostni količini kot jedrno DNK. V nasprotju z jedrno DNK, ki se v enaki količini podeduje od obeh staršev, se mtDNK deduje le po materi (20). Kar pomeni, da je za ugotavljanje sorodstvenih povezav s primerjalno analizo genotipov mtDNK dovolj le primerjava med sorodniki po materi (tako lahko pride v poštev tudi daljno sorodstvo), medtem ko je za analizo jedrne DNK potrebno poznavanje DNK bližnjega sorodstva, kot so starši ali bratje/sestre, če so starši že pokojni (21, 22).

DNK

Splošno

Človeško telo je sestavljeno iz več milijard celic, ki so zelo majhne in jih merimo v tisočinkah milimetra. V centru vsake celice (razen zrelih rdečih krvničk) je jedro, ki uravnava delovanje in razvoj celice. Celično jedro je zelo pomembno, saj vsebuje nitaste strukture, imenovane kromosomi. V njih je molekula z zapletenim imenom deoksiribonukleinska kislina ali krajše DNK.

DNK je zelo dolga molekula, sestavljena iz dveh verig, zavitih druga okoli druge v dvojno spiralo ali vijačnico. DNK je človeški dedni material (človeški genom), v katerem se v besede in stavke povezujejo štirje elementi (nukleotidi), označeni s črkami A, C, G in T. V njih je zapisana vsa razlika med posamezniki, kot so spol, barva las in oči, višina in tako dalje. DNK je torej biokemična osnova vsakega posameznika, brez katere ne bi bilo življenja in raznovrstnosti. Prenaša se s staršev na potomce. Najpomembnejša lastnost dvojne vijačnice je, da prečke, ki povezujejo obe vijačnici, predstavljajo zmeraj isti pari nukleotidov: A se vedno pari s T in narobe, G se vedno pari s C in narobe. Zaporedje nukleotidov vzdolž ene verige določi torej zaporedje vzdolž druge. Ta lastnost omogoča, da se molekula DNK med podvojevanjem odpre kot zadrga in na vsaki od obeh verig dvojne vijačnice nastane nova kopija (23). Zaradi takega načina podvojevanja DNK imajo večinoma vse celice istega organizma enak zapis DNK in zato ni pomembno, katere biološke vzorce posameznika v forenzičnih preiskavah primerjamo med seboj.

Lastnosti jedrne DNK

V človeških telesnih celicah je jedrna DNK razdeljena na 46 kromosomov, ki se jih po velikosti razdeli v 23 parov, kromosoma v paru sta enaka po velikosti in obliki. Izjema sta spolna kromosoma, X in Y, pri katerih je kromosom Y, ki določa moški spol, precej manjši od kromosoma X. Število kromosomov je sodo, ker ga sestavljajo kromosomi obeh staršev, od vsakega od staršev en niz. Zato so tudi dedne zasnove za vsako lastnost dvojne. Bratje in sestre podedujejo od istih staršev drugačno kombinacijo kromosomov in se zato razlikujejo drug od drugega. Izjema so enojajčni dvojčki, ki so v bistvu naravne kopije (kloni) (24, 25).

Lastnosti mitohondrijske DNK

Edini celični organeli, ki poleg jedra vsebujejo DNK, so mitohondriji, ki jih pogosto imenujejo tudi celične električne centrale, saj iz hrane sproščajo energijo za delo. MtDNK se od jedrne razlikuje po več značilnostih. Za razliko od dvojne vijačnice jedrne DNK, ki je linearne oblike, je mtDNK kovaletno zaprta krožna molekula. Njena velikost je le 16.569 baznih parov (bp) (26), medtem ko obsega dolžina jedrne DNK v človeških telesnih celicah približno 6 milijonov baznih parov. Večina mtDNK predstavlja konservirana kodogena regija, ki kodira 22tRNK, dve ribosomalni rRNK in 13 peptidov, ki so vključeni v proces oksidacije v dihalni verigi (27). Čez manjši del mtDNK (1100 bp) pa se razteza nekodogena kontrolna regija, imenovana tudi D-zanka (angl. D-loop), ki skrbi za replikacijo mtDNK in transkripcijo proteinov. Kontrolna regija predstavlja najbolj raziskano področje na mtDNK. Sestavljeno je iz dveh hipervariabilnih področij HVI in HVII, za kateri je značilna visoka variabilnost (28, 29).

Druga značilnost mtDNK je, da se mitohondriji v celicah pojavljajo v velikem številu, zaradi česar je uspeh analize mtDNK pri preiskavah starih kosti, zelo razpadlih ali uničenih človeških posmrtnih ostankov veliko večji v primerjavi z jedrno DNK, ki se nahaja le v dveh kopijah, medtem ko je mtDNK navzoča tudi v nekaj tisoč kopijah (19, 30). V nasprotju z jedrno DNK, ki se deduje po Mendlovih zakonih, pa se mitohondrijska DNK deduje le prek mater in se s hčeraми prenaša iz roda v rod na vse potomstvo. To predstavlja naslednjo veliko prednost mtDNK analiz pred jedrno, saj je z jedrno DNK mogoče le preverjanje bližnjih sorodstvenih povezav, preverjanje med daljnimi sorodniki, ki jih loči nekaj rodov, pa zaradi rekombinacije ni mogoče. V teh primerih je edini način preverjanja sorodstvenih povezav analiza mtDNK, ki se deduje izključno po materi in se ne rekombinira (20, 31). Ker se mtDNK deduje le po materini strani, bi se moral njen zapis ohranjati skozi rodove nespremenjen, vendar pa ni čisto tako, saj se mtDNK zaradi visoke stopnje mutacij zelo hitro spreminja (32, 33). Večina genetskih sprememb so preproste bazne substitucije (tranzicije in transverzije). Osnovni vzrok visokega števila mutacij je verjetno večje število pomnoževanj mtDNK, ki se v primerjavi z jedrno DNK pomnožuje tudi pet do desetkrat hitreje. Večja pogostnost mutacij v mtDNK pa je lahko tudi posledica neučinkovitih popravljalnih mehanizmov in nezanesljivost procesa replikacije DNK. Število mutacij je v povprečju za en razred večje kot pri jedrni DNK. Večina mutacij se pojavlja v kontrolni regiji (angl. D-loop region) (34–36). Za mtDNK je tako značilna variabilnost, do katere prihaja znotraj določene populacije (intraspecifična divergenca) ali med posameznimi populacijami (interspecifična divergenca). Analiza mtDNK tako omogoča zasledovanje razlik v strukturi populacije in med populacijami (37, 38). V področjih HVI in HVII, kontrolne regije mitohondrijskega genoma, se posamezniki med kavkaškimi populacijami razlikujejo drug od drugega v povprečju na 8 nukleotidnih mestih, medtem ko se Afričani in Američani kar na 14 mestih (29). Tako so postale analize mtDNK zanimive tudi za ugotavljanje genetske strukture populacij, filogenetskih odnosov med njimi in naselitve narodov v preteklosti.

Mikrosateliti

Značilnost človeške jedrne DNK je, da njen velik del (30 %) zavzemajo ponavljajoča se zaporedja DNK, ki v večini primerov predstavljajo zelo polimorfna področja. V to skupino hipervariabilnih polimorfnih področij sodijo tudi mikrosateliti, ki jih danes največkrat uporabljajo pri genetskih identifikacijskih testih pri prepoznavanju (identifikaciji) oseb in ugotavljanju sorodstvenih povezav (39–45). Mikrosateliti ali lokusi STR (angl. short tandem repeat – male tandemske ponovitve), so tista področja v človeškem genomu, v katerih se posamezniki med seboj najbolj razlikujemo. Odkrila sta jih Weber in May leta 1989 (46). Po človeškem genomu so raztreseni povsem naključno in jih najdemo na približno vsakih 6000 baznih parov (nukleotida v paru). Ne kodirajo proteinov in prav zato jih velikokrat imenujemo odvečna DNK (angl. junk DNA). Njihova biološka funkcija še ni razjasnjena. V osnovi so mikrosateliti zelo kratka, ponavljajoča se zaporedja nukleotidov (2 do 7 nukleotidov skupaj tvorijo en motiv), ki se razlikujejo drug od drugega po številu zaporednih ponovitev osnovnega motiva oziroma po dolžini. V forenzičnih preiskavah se večinoma uporabljajo mikrosateliti s štiri bazne pare dolgim osnovnim motivom, katerih dolžina večinoma ne presega 400 baznih parov. Različico števila ponovitev osnovnega motiva na določenem področju imenujemo alel. Te razlike so večinoma individualno specifične, zato so mikrosateliti primerni za določevanje sorodstvenih povezav in identifikacijo oseb. Za vsako posamezno področje obstaja večje število različnih alelov. Polimorfizem področij STR torej temelji na variacijah v številu ponovitev osnovnega motiva, posledica pa je visoka variabilnost v dolžini posameznih alelov. Vsak posameznik ima za vsako področje STR dva alela, enega je podedoval od matere in drugega od očeta. Rodovniške analize so pokazale, da se lokusi STR razporejajo neodvisno od staršev na potomce, kažejo kodominantno naravo alelov in se dedujejo po Mendlovih zakonih dedovanja, po katerih otrok vedno podeduje en alel od matere in enega od očeta (47).

Nomenklatura mikrosatelitov se loči glede na položaj, kje v genomu posameznikov se mikrosatelit nahaja. V primeru, da leži mikrosatelit znotraj določenega gena, nosi njegovo oznako (npr. HUMvWA31 je mikrosatelit, ki se nahaja v intronu 40 gena za von Willebrandov faktor, ki leži na kromosomu 12). Ko pa mikrosatelit leži zunaj genov, temelji nomenklatura na štirikomponentnem sistemu, in sicer je sestavljena iz črke D (simbolizira DNK), sledi ena od števil 1 do 22 (nespolni kromosomi) ali črka X oz. Y (spolna kromosoma), kar označuje, na katerem kromosomu se mikrosatelit nahaja; sledijo črke S, F ali Z (označujejo ponovljivost področja) in na koncu številke od 1 dalje, označujejo pa zaporedno številko polimorfizma, najdenega na tem kromosomu (48).

Heteroplazmija

Za mtDNK je značilno, da ima popolnoma samostojen replikacijski sistem, za katerega je poznano, da ne prihaja do rekombinacij (49). Nukleotidno zaporedje (sekvenca) mtDNK se zato obravnava kot enolokusno ali haplotipsko (50, 51). Najbolj informativna enojna lokusa na mtDNK, ki se uporabljata za identifikacijske teste, sta področji HVI in HVII kontrolne regije.

Ker se mtDNK deduje po materi, bi morala biti mtDNK v posamezniku nujno

Lastnosti mitohondrijske DNK

Edini celični organeli, ki poleg jedra vsebujejo DNK, so mitohondriji, ki jih pogosto imenujejo tudi celične električne centrale, saj iz hrane sproščajo energijo za delo. MtDNK se od jedrne razlikuje po več značilnostih. Za razliko od dvojne vijačnice jedrne DNK, ki je linearne oblike, je mtDNK kovaletno zaprta krožna molekula. Njena velikost je le 16.569 baznih parov (bp) (26), medtem ko obsega dolžina jedrne DNK v človeških telesnih celicah približno 6 milijonov baznih parov. Večina mtDNK predstavlja konservirana kodogena regija, ki kodira 22tRNK, dve ribosomalni rRNK in 13 peptidov, ki so vključeni v proces oksidacije v dihalni verigi (27). Čez manjši del mtDNK (1100 bp) pa se razteza nekodogena kontrolna regija, imenovana tudi D-zanka (angl. D-loop), ki skrbi za replikacijo mtDNK in transkripcijo proteinov. Kontrolna regija predstavlja najbolj raziskano področje na mtDNK. Sestavljeno je iz dveh hipervariabilnih področij HVI in HVII, za kateri je značilna visoka variabilnost (28, 29).

Druga značilnost mtDNK je, da se mitohondriji v celicah pojavljajo v velikem številu, zaradi česar je uspeh analize mtDNK pri preiskavah starih kosti, zelo razpadlih ali uničenih človeških posmrtnih ostankov veliko večji v primerjavi z jedrno DNK, ki se nahaja le v dveh kopijah, medtem ko je mtDNK navzoča tudi v nekaj tisoč kopijah (19, 30). V nasprotju z jedrno DNK, ki se deduje po Mendlovih zakonih, pa se mitohondrijska DNK deduje le prek mater in se s hčeraми prenaša iz roda v rod na vse potomstvo. To predstavlja naslednjo veliko prednost mtDNK analiz pred jedrno, saj je z jedrno DNK mogoče le preverjanje bližnjih sorodstvenih povezav, preverjanje med daljnimi sorodniki, ki jih loči nekaj rodov, pa zaradi rekombinacije ni mogoče. V teh primerih je edini način preverjanja sorodstvenih povezav analiza mtDNK, ki se deduje izključno po materi in se ne rekombinira (20, 31). Ker se mtDNK deduje le po materini strani, bi se moral njen zapis ohranjati skozi rodove nespremenjen, vendar pa ni čisto tako, saj se mtDNK zaradi visoke stopnje mutacij zelo hitro spreminja (32, 33). Večina genetskih sprememb so preproste bazne substitucije (tranzicije in transverzije). Osnovni vzrok visokega števila mutacij je verjetno večje število pomnoževanj mtDNK, ki se v primerjavi z jedrno DNK pomnožuje tudi pet do desetkrat hitreje. Večja pogostnost mutacij v mtDNK pa je lahko tudi posledica neučinkovitih popravilnih mehanizmov in nezanesljivost procesa replikacije DNK. Število mutacij je v povprečju za en razred večje kot pri jedrni DNK. Večina mutacij se pojavlja v kontrolni regiji (angl. D-loop region) (34–36). Za mtDNK je tako značilna variabilnost, do katere prihaja znotraj določene populacije (intraspecifična divergenca) ali med posameznimi populacijami (interspecifična divergenca). Analiza mtDNK tako omogoča zasledovanje razlik v strukturi populacije in med populacijami (37, 38). V področjih HVI in HVII, kontrolne regije mitohondrijskega genoma, se posamezniki med kavkaškimi populaciji razlikujejo drug od drugega v povprečju na 8 nukleotidnih mestih, medtem ko se Afričani in Američani kar na 14 mestih (29). Tako so postale analize mtDNK zanimive tudi za ugotavljanje genetske strukture populacij, filogenetskih odnosov med njimi in naselitve narodov v preteklosti.

Mikrosateliti

Značilnost človeške jedrne DNK je, da njen velik del (30 %) zavzemajo ponavljajoča se zaporedja DNK, ki v večini primerov predstavljajo zelo polimorfna področja. V to skupino hipervariabilnih polimorfnih področij sodijo tudi mikrosateliti, ki jih danes največkrat uporabljajo pri genetskih identifikacijskih testih pri prepoznavanju (identifikaciji) oseb in ugotavljanju sorodstvenih povezav (39–45). Mikrosateliti ali lokusi STR (angl. short tandem repeat – male tandemske ponovitve), so tista področja v človeškem genomu, v katerih se posamezniki med seboj najbolj razlikujemo. Odkrila sta jih Weber in May leta 1989 (46). Po človeškem genomu so raztreseni povsem naključno in jih najdemo na približno vsakih 6000 baznih parov (nukleotida v paru). Ne kodirajo proteinov in prav zato jih velikokrat imenujemo odvečna DNK (angl. junk DNA). Njihova biološka funkcija še ni razjasnjena. V osnovi so mikrosateliti zelo kratka, ponavljajoča se zaporedja nukleotidov (2 do 7 nukleotidov skupaj tvorijo en motiv), ki se razlikujejo drug od drugega po številu zaporednih ponovitev osnovnega motiva oziroma po dolžini. V forenzičnih preiskavah se večinoma uporabljajo mikrosateliti s štiri bazne pare dolgim osnovnim motivom, katerih dolžina večinoma ne presega 400 baznih parov. Različico števila ponovitev osnovnega motiva na določenem področju imenujemo alel. Te razlike so večinoma individualno specifične, zato so mikrosateliti primerni za določevanje sorodstvenih povezav in identifikacijo oseb. Za vsako posamezno področje obstaja večje število različnih alelov. Polimorfizem področij STR torej temelji na variacijah v številu ponovitev osnovnega motiva, posledica pa je visoka variabilnost v dolžini posameznih alelov. Vsak posameznik ima za vsako področje STR dva alela, enega je podedoval od matere in drugega od očeta. Rodovniške analize so pokazale, da se lokusi STR razporejajo neodvisno od staršev na potomce, kažejo kodominantno naravo alelov in se dedujejo po Mendlovih zakonih dedovanja, po katerih otrok vedno podeduje en alel od matere in enega od očeta (47).

Nomenklatura mikrosatelitov se loči glede na položaj, kje v genomu posameznikov se mikrosatelit nahaja. V primeru, da leži mikrosatelit znotraj določenega gena, nosi njegovo oznako (npr. HUMvWA31 je mikrosatelit, ki se nahaja v intronu 40 gena za von Willebrandov faktor, ki leži na kromosomu 12). Ko pa mikrosatelit leži zunaj genov, temelji nomenklatura na štirikomponentnem sistemu, in sicer je sestavljena iz črke D (simbolizira DNK), sledi ena od števil 1 do 22 (nespolni kromosomi) ali črka X oz. Y (spolna kromosoma), kar označuje, na katerem kromosomu se mikrosatelit nahaja; sledijo črke S, F ali Z (označujejo ponovljivost področja) in na koncu številke od 1 dalje, označujejo pa zaporedno številko polimorfizma, najdenega na tem kromosomu (48).

Heteroplazmija

Za mtDNK je značilno, da ima popolnoma samostojen replikacijski sistem, za katerega je poznano, da ne prihaja do rekombinacij (49). Nukleotidno zaporedje (sekvenca) mtDNK se zato obravnava kot enolokusno ali haplotipsko (50, 51). Najbolj informativna enojna lokusa na mtDNK, ki se uporabljata za identifikacijske teste, sta področji HVI in HVII kontrolne regije.

Ker se mtDNK deduje po materi, bi morala biti mtDNK v posamezniku nujno

monoklonalna. Torej naj bi bila pri vsakem posamezniku opažena le ena sekvenca mtDNK. Vendar pa večina raziskovalcev poroča o pojavu heteroplazmije zaradi visoke ravni mutacij, ki so verjetno posledica hitrega pomnoževanja mtDNK, neučinkovitih popravljenih mehanizmov in neuspešne replikacije (52–55). Heteroplazmija je definirana kot stanje, ko posameznik vsebuje več kot eno vrsto mtDNK. Posamezna vrsta je določena s sekvenco mtDNK ali haplotipom. Če sta v individuumu opaženi dve vrsti mtDNK, se le-ti običajno razlikujeta v eni sami bazi. Heteroplazmija je pri ljudeh opažena na različne načine:

- osebe imajo lahko več kot eno vrsto mtDNK v istem tkivu,
- osebe imajo lahko v enem tkivu eno vrsto mtDNK in v drugem tkivu drugo vrsto,
- osebe so lahko heteroplazmične za eno tkivo, medtem ko so za drugo tkivo homoplazmične.

Izolacija DNK iz kosti

Raziskovanja na področju izolacije DNK iz kosti so potekala mnogo let. Za učinkovito izvedbo identifikacije okostij je bilo treba razviti primerno metodo. Prve uspešno izvedene analize DNK, pridobljene iz kosti, je opravil Henry Lee (11). Vpliv časa na samodegradacijo DNK v kosti so raziskovali William Perry in drugi (12), s tem da je sam zakopal trupla pod različnimi pogoji za različno dolga obdobja. Zaključek njegovih preiskav je bil, da na hitrost degradacije DNK najbolj vplivata visoka vlažnost in temperatura. Od leta 1991 pa je v ZDA ustanovljena skupina AFDIL (Armed Forces DNA Identification Laboratory), ki ji je zaupana identifikacija izginulih vojakov z DNK tehnologijo ter pomoč pri identifikaciji posmrtnih ostankov ameriških vojakov, ubitih v korejski, vietnamski in drugi svetovni vojni. Število le-teh obsega: več kot 8000 ubitih v korejski vojni, več kot 2000 mrtvih v konfliktih v jugovzhodni Aziji in več kot 75.000 ubitih v II. svetovni vojni. Izkušnje za uspešno izvedbo izolacije DNK za analizo mtDNK so si nabirali z analizami, izvedenimi na kosteh vietnamskih vojakov, ki so shranjene v narodnem muzeju v Virginiji (4, 15, 55). In tako so postali ena najboljših skupin na tem področju. Čeprav je DNK v kosteh veliko bolj stabilna kot v vseh drugih tkivih (11–14), je kljub temu lahko tako razgrajena, da včasih ni mogoče pridobiti dovolj ohranjene jedrne DNK za analizo STR z metodo PCR. V teh primerih poteka identifikacija na osnovi analize mtDNK (56, 57, 58). Skupaj s stopnjo poroznosti kosti drastično pada tudi kvaliteta izolirane DNK, tako da včasih tudi identifikacija na osnovi mtDNK ni več mogoča.

Za analizo DNK so večinoma najprimernejše dolge kosti (stegenica, nadlahtnica), sledijo medenične kosti in kosti lobanje. Uporabijo pa tudi kosti reber. Za uspešno izolacijo DNK iz kosti se uporablja organsko ekstrakcijo (4, 11–15, 55, 58, 59).

Najprej kost razžagajo na koščke v velikosti oreha. Pred izolacijo DNK pa morajo vsak košček kosti temeljito očistiti. S kosti odstranijo vse sledi, ki se nahajajo na površini, to storijo tako, da kost temeljito zbrusijo z brusilnim papir-

jem. Kost nato umijejo v vodikovem peroksidu, da se uniči DNK, ki se nahaja na zunanji površini in izvira od drugega biološkega materiala in bi bil lahko pri analizi moteč. Kost se ob navzočnosti tekočega dušika zdrobi s pomočjo možnarja v fin prah. Po 5 g kosti v prahu nato shranijo v posamezno sterilno centrifugirko. Da se iz kosti odstrani kalcij, je treba kost inkubirati v 500 mM EDTA vsaj tri dni pri 4°C, ob menjavi pufra na 24 ur. Temu postopku sledi liza osteocit ob navzočnosti ekstrakcijskega pufra, ki vsebuje SDS in proteinazo K. Inkubacija poteka dva dni pri 56°C. Sledi čiščenje oziroma ločevanje DNK od proteinov z organsko fenol-kloroformsko ekstrakcijo. Na koncu pa se celotno izolirano DNK prečisti in skoncentrira z ultrafiltracijo z Amicon Centricon kolonco, da se odstrani inhibitorje verižne reakcije s polimerazo (PCR). V raztopini se sedaj nahajata tako mtDNK kot tudi jedrna DNK. Celoten postopek izolacije DNK iz kosti traja približno 10 do 14 dni.

Analiza mikrosatelitov

Najnovejša in tudi najbolj zanesljiva metoda, ki se danes uporablja za identifikacijo oseb in za ugotavljanje sorodstvenih povezav, npr. očetovstva, je določanje mikrosatelitnih polimorfizmov s pomočjo verižne reakcije s polimerazo – PCR metode (60). Pri analizi nastane specifičen alelni vzorec ali profil DNK analiziranih področij DNK, zato imenujemo to metodo profiliranje DNK. Metoda določanja genetskih profilov oz. profilov DNK je razmeroma preprosta in danes tudi avtomatizirana analiza, s katero se meri dolžina alelov posameznega področja na DNK molekuli, ki pa se ga pred analizo pomnoži do milijon kopij z metodo verižne reakcije s polimerazo. Analiza področij STR se je začela kot metoda uporabljati šele v začetku devetdesetih (61–63), vendar jo danes v identifikacijske namene uporablja večina forenzičnih laboratorijev po svetu (64). Mikrosateliti so za analizo ugodni, ker jih je enostavno pomnožiti, so razmeroma majhni in jih je lahko ločiti v diskretne alele z gelsko ali kapilarno elektroforezo. Interpretacija rezultatov je nedvomljiva in pri merjenju dolžin ne prihaja do nejasnosti, saj diskretne alele posameznega področja STR lahko neposredno primerjamo z znanimi alelami tega področja s t. i. alelno lestvico. Z razvojem metod, ki temeljijo na detekciji fluorescentno označenih produktov PCR, se je uspešnost analize STR še dodatno povečala, ker lahko naenkrat pomnožimo in istočasno analiziramo različna področja STR (do 16 različnih področij STR). Velikost posameznih alelov, ki smo jih ločili z gelsko ali kapilarno elektroforezo, pa določamo avtomatizirano, z uporabo posebnega instrumenta, avtomatskega sekvencerja (377 DNA Sequencer ali 310 Genetic Analyzer), ki vsebuje analitski računalniški program. Rezultati analiz so podani v obliki elektroferograma, ki pove velikost analiziranih alelov in njihovo relativno koncentracijo. Posamezen alel predstavlja vrh v grafu, medtem ko je njegova koncentracija podana s površino pod vrhom.

Tako zasnovana analiza STR omogoča identifikacijo biološke sledi (kosti) z zelo nizko količino DNK, ki je lahko tudi že precej razgrajena. Analiza 10 področij STR naj bi bila možna že pri 100 pikogramih nerazgrajene DNK, kar je približno

monoklonalna. Torej naj bi bila pri vsakem posamezniku opažena le ena sekvenca mtDNK. Vendar pa večina raziskovalcev poroča o pojavu heteroplazmije zaradi visoke ravni mutacij, ki so verjetno posledica hitrega pomnoževanja mtDNK, neučinkovitih popravljenih mehanizmov in neuspešne replikacije (52–55). Heteroplazmija je definirana kot stanje, ko posameznik vsebuje več kot eno vrsto mtDNK. Posamezna vrsta je določena s sekvenco mtDNK ali haplotipom. Če sta v individuumu opaženi dve vrsti mtDNK, se le-ti običajno razlikujeta v eni sami bazi. Heteroplazmija je pri ljudeh opažena na različne načine:

- osebe imajo lahko več kot eno vrsto mtDNK v istem tkivu,
- osebe imajo lahko v enem tkivu eno vrsto mtDNK in v drugem tkivu drugo vrsto,
- osebe so lahko heteroplazmične za eno tkivo, medtem ko so za drugo tkivo homoplazmične.

Izolacija DNK iz kosti

Raziskovanja na področju izolacije DNK iz kosti so potekala mnogo let. Za učinkovito izvedbo identifikacije okostij je bilo treba razviti primerno metodo. Prve uspešno izvedene analize DNK, pridobljene iz kosti, je opravil Henry Lee (11). Vpliv časa na samodegradacijo DNK v kosti so raziskovali William Perry in drugi (12), s tem da je sam zakopal trupla pod različnimi pogoji za različno dolga obdobja. Zaključek njegovih preiskav je bil, da na hitrost degradacije DNK najbolj vplivata visoka vlažnost in temperatura. Od leta 1991 pa je v ZDA ustanovljena skupina AFDIL (Armed Forces DNA Identification Laboratory), ki ji je zaupana identifikacija izginulih vojakov z DNK tehnologijo ter pomoč pri identifikaciji posmrtnih ostankov ameriških vojakov, ubitih v korejski, vietnamski in drugi svetovni vojni. Število le-teh obsega: več kot 8000 ubitih v korejski vojni, več kot 2000 mrtvih v konfliktih v jugovzhodni Aziji in več kot 75.000 ubitih v II. svetovni vojni. Izkušnje za uspešno izvedbo izolacije DNK za analizo mtDNK so si nabirali z analizami, izvedenimi na kosteh vietnamskih vojakov, ki so shranjene v narodnem muzeju v Virginiji (4, 15, 55). In tako so postali ena najboljših skupin na tem področju. Čeprav je DNK v kosteh veliko bolj stabilna kot v vseh drugih tkivih (11–14), je kljub temu lahko tako razgrajena, da včasih ni mogoče pridobiti dovolj ohranjene jedrne DNK za analizo STR z metodo PCR. V teh primerih poteka identifikacija na osnovi analize mtDNK (56, 57, 58). Skupaj s stopnjo poroznosti kosti drastično pada tudi kvaliteta izolirane DNK, tako da včasih tudi identifikacija na osnovi mtDNK ni več mogoča.

Za analizo DNK so večinoma najprimernejše dolge kosti (stegenica, nadlahtnica), sledijo medenične kosti in kosti lobanje. Uporabijo pa tudi kosti reber. Za uspešno izolacijo DNK iz kosti se uporablja organsko ekstrakcijo (4, 11–15, 55, 58, 59).

Najprej kost razžagajo na koščke v velikosti oreha. Pred izolacijo DNK pa morajo vsak košček kosti temeljito očistiti. S kosti odstranijo vse sledi, ki se nahajajo na površini, to storijo tako, da kost temeljito zbrusijo z brusilnim papir-

jem. Kost nato umijejo v vodikovem peroksidu, da se uniči DNK, ki se nahaja na zunanji površini in izvira od drugega biološkega materiala in bi bil lahko pri analizi moteč. Kost se ob navzočnosti tekočega dušika zdrobi s pomočjo možnarja v fin prah. Po 5 g kosti v prahu nato shranijo v posamezno sterilno centrifugirko. Da se iz kosti odstrani kalcij, je treba kost inkubirati v 500 mM EDTA vsaj tri dni pri 4°C, ob menjavi pufra na 24 ur. Temu postopku sledi liza osteocit ob navzočnosti ekstrakcijskega pufra, ki vsebuje SDS in proteinazo K. Inkubacija poteka dva dni pri 56°C. Sledi čiščenje oziroma ločevanje DNK od proteinov z organsko fenol-kloroformsko ekstrakcijo. Na koncu pa se celotno izolirano DNK prečisti in skoncentrira z ultrafiltracijo z Amicon Centricon kolonco, da se odstrani inhibitorje verižne reakcije s polimerazo (PCR). V raztopini se sedaj nahajata tako mtDNK kot tudi jedrna DNK. Celoten postopek izolacije DNK iz kosti traja približno 10 do 14 dni.

Analiza mikrosatelitov

Najnovejša in tudi najbolj zanesljiva metoda, ki se danes uporablja za identifikacijo oseb in za ugotavljanje sorodstvenih povezav, npr. očetovstva, je določanje mikrosatelitnih polimorfizmov s pomočjo verižne reakcije s polimerazo – PCR metode (60). Pri analizi nastane specifičen alelni vzorec ali profil DNK analiziranih področij DNK, zato imenujemo to metodo profiliranje DNK. Metoda določanja genetskih profilov oz. profilov DNK je razmeroma preprosta in danes tudi avtomatizirana analiza, s katero se meri dolžina alelov posameznega področja na DNK molekuli, ki pa se ga pred analizo pomnoži do milijon kopij z metodo verižne reakcije s polimerazo. Analiza področij STR se je začela kot metoda uporabljati šele v začetku devetdesetih (61–63), vendar jo danes v identifikacijske namene uporablja večina forenzičnih laboratorijev po svetu (64). Mikrosateliti so za analizo ugodni, ker jih je enostavno pomnožiti, so razmeroma majhni in jih je lahko ločiti v diskretne alele z gelsko ali kapilarno elektroforezo. Interpretacija rezultatov je nedvomljiva in pri merjenju dolžin ne prihaja do nejasnosti, saj diskretne alele posameznega področja STR lahko neposredno primerjamo z znanimi alelami tega področja s t. i. alelno lestvico. Z razvojem metod, ki temeljijo na detekciji fluorescentno označenih produktov PCR, se je uspešnost analize STR še dodatno povečala, ker lahko naenkrat pomnožimo in istočasno analiziramo različna področja STR (do 16 različnih področij STR). Velikost posameznih alelov, ki smo jih ločili z gelsko ali kapilarno elektroforezo, pa določamo avtomatizirano, z uporabo posebnega instrumenta, avtomatskega sekvencerja (377 DNA Sequencer ali 310 Genetic Analyzer), ki vsebuje analitski računalniški program. Rezultati analiz so podani v obliki elektroferograma, ki pove velikost analiziranih alelov in njihovo relativno koncentracijo. Posamezen alel predstavlja vrh v grafu, medtem ko je njegova koncentracija podana s površino pod vrhom.

Tako zasnovana analiza STR omogoča identifikacijo biološke sledi (kosti) z zelo nizko količino DNK, ki je lahko tudi že precej razgrajena. Analiza 10 področij STR naj bi bila možna že pri 100 pikogramih nerazgrajene DNK, kar je približno

16 telesnih celic. Vendar se zaradi nevarnosti stohastičnega efekta, ko zaradi nizke koncentracije pride v analizo le eden od obeh alelov, priporoča analiza z 1–2 ng DNK. Uspešnost metode je torej odvisna od količine in kakovosti izolirane DNK in s tem neposredno od količine in ohranjenosti bioloških vzorcev, ki so bili poslani v preiskavo. Za forenzične vzorce je značilno, da vsebujejo velikokrat majhno količino delno razgrajene DNK, saj so biološke sledi izpostavljene zunanjim dejavnikom (kemijskim in biološkim). Na razgradnjo DNK v vzorcu sledi pa vplivamo tudi sami, s tem ko vzorec sledi neprimerno odvzamemo in/ali ga neprimerno shranimo.

Metoda prstnih odtisov DNK (angl. DNA fingerprinting), ki temelji na analizi polimorfizmov restrikcijskih fragmentov (angl. Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP), je bila zgodovinsko prva genetska identifikacijska metoda s preiskavo polimorfizmov DNK in je dodobra pretresla področje kriminalistike in sodne medicine. Razvil jo je Alec Jeffreys (Velika Britanija). Prvič je bila uporabljena na civilnem sodišču v Veliki Britaniji leta 1985, in sicer za reševanje imigracijskega primera. Kot začetek njenega znamenitega pohoda pa velja leto 1986 s primerom Enderby, ko je bil na podlagi metode prstnega odtisa DNK prijet posiljevalec in morilec dveh 15-letnih deklic (leta 1983 in 1986 v mestecu Enderby v Veliki Britaniji). Čeprav je metoda prstnih odtisov DNK individualno specifična, medtem ko profil DNK sam po sebi ne ponuja individualne specifičnosti, šele z analizo večjega števila področij STR dobimo za posameznika individualno specifičen vzorec alelov, metodo prstnih odtisov DNK danes opuščajo, ker ima precej šibkosti. Metoda prstnih odtisov DNK zahteva zelo veliko subjektivnih izkušenj, saj je razlaga rezultatov zaradi velikega števila fragmentov in slabe ločljivosti velikokrat vprašljiva, primerjava med laboratoriji ni mogoča, kot tudi ni mogoče shranjevati podatkov v obliki podatkovne baze, avtomatizacija analiz ni mogoča. Poleg navedenega je njena pomanjkljivost tudi potreba po veliki količini DNK, saj se količina, potrebna za analizo, giblje med 50 do 500 ng visoko ohranjene DNK, to je 50-krat do 500-krat več kot v primeru analize STR, zato kar iz 20 % forenzičnih vzorcev ni možna analiza z metodo RFLP. Zlasti identifikacija okostij je s to metodo skoraj v večini primerov neuspešna. Dodatna šibkost te metode je, da je čas, potreben za analizo, dolg nekaj tednov, medtem ko se analiza STR zaključi že v 1 do 2 dneh in pri tem ne zahteva uporabe radioaktivnih izotopov, kot to velja za metodo RFLP.

Metoda profiliranja DNK poteka v več korakih:

- izolacija, čiščenje in določanje koncentracije DNK v forenzičnem vzorcu (kost, zob),
- izolacija in določanje koncentracije DNK v primerjalnem vzorcu,
- ciljanje točno določenih odsekov na DNK molekuli,
- pomnoževanje določenih odsekov DNK v velikem številu,
- ločevanje pomnoženih fragmentov DNK glede na velikost in
- določanje velikosti posameznega pomnoženega fragmenta DNK iz vzorca.

Dokazovanje sorodstvenih povezav z analizo mikrosatelitov

Testi ugotavljanja sorodstvenih povezav potekajo tako, da se posamezni genetski profili primerjajo med seboj. Ugotavljajo lahko zelo različne sorodstvene povezave, vendar se analize med seboj razlikujejo glede na stopnjo sorodstvene povezanosti pogrešane osebe. Bistvo testov je, da se za vsak posamezni lokus preveri navzočnost obeh alel in se ju primerja z aleli istega področja sorodnikov. Bolj ko sta si dve osebi sorodni, več skupnih alelov imata. Tako imata mati in otrok oziroma oče in otrok 50% skupnih alelov, saj otrok podeduje polovico alelov od matere in drugo polovico od očeta. Bratje in sestre delijo med seboj le še 25% alelov.

Sistem delovanja testov ugotavljanja sorodstvenih povezav se lahko prikaže na primeru preverjanja spornega očetovstva. Pri preverjanju spornih očetovstev na posameznem lokusu očetovstvo pritrdimo v primeru, ko se pri domnevnem očetu najde enega od alelov. Če takega alela ni za posamezno preiskano področje STR, očetovstvo za posamezen lokus izključimo. Domnevnega očeta izključimo kot biološkega očeta, ko nam rezultati pokažejo izključitev vsaj na dveh analiziranih lokusih (69). Na enak način postopamo nato še za domnevno mater. Vendar mora mati vsebovati le tiste alele, ki jih nismo pripisali očetu. Zavedati se je treba, da so izključitve brezpogojne, medtem ko potrditve temeljijo na verjetnosti. Prav zato moramo biti pri izključitvah zelo previdni, ker se pri delu pojavljajo tudi proceduralne napake, ki lahko povzročijo napačno izključitev, povsem neverjetno pa je, da bi povzročile napačne potrditve. Poleg proceduralnih napak pa lahko probleme povzročijo tudi mutacije, ki so v spolnih celicah precej visoke in nam v primerih dejanskega biološkega očeta/matere pokažejo izključitev očetovstva/materinstva, ker pride do neujemanja med aleli (70). Za prepričljiv rezultat analize spornega očetovstva morajo dokazati izključitev na vsaj dveh neodvisnih področjih (pravilo dvojne izključitve). Za analize sorodstvenih povezav pa so kot primerjalni vzorci, poleg matere in očeta, primerni tudi otroci, sestre ali bratje pogrešane osebe.

Ker potrditev sorodstvene povezanosti ni dokončna, ampak je pogojena z verjetnostjo, je treba upoštevati minimalno število analiziranih področij, ki zadosti kriteriju, potrebnem, da lahko popolnoma določimo sorodstvene odnose. Tako je v ZDA podana zakonska zahteva, da mora skupna verjetnost izključitve pri določanju očetovstva presegati 99 %, da lahko očetovstvo potrdimo (39). Pri uporabi področij STR za ugotavljanje sorodstvenih povezav starši–otrok, pa je najmanjše število, ki zadosti temu kriteriju, analiza 9 področij STR. Pogoj za izračun verjetnosti pa je opravljena populacijska genetska študija področij, ki jih bomo analizirali (71–76). S pomočjo statističnih metod lahko izračunamo relativne frekvence alelov v populaciji. Na osnovi le-teh lahko določimo dva parametra: verjetnost ujemanja in diskriminacijsko moč, ki kažeta učinkovitost lokusov v analizi (77, 78). Za ocenjevanje moči genetskega dokaza je treba izračunati verjetnost, da domnevna starša (brat, sestra, otrok) nista prava starša (brat, sestra, otrok) (78, 79). Z izračunom skupne verjetnosti izključitve starševstva povemo, kakšna je zmožnost identifikacijskega testa, da kot biološke starše izključi napačno določene starše iz dane populacije. Skupna verjetnost izključitve narašča s številom anali-

16 telesnih celic. Vendar se zaradi nevarnosti stohastičnega efekta, ko zaradi nizke koncentracije pride v analizo le eden od obeh alelov, priporoča analiza z 1–2 ng DNK. Uspešnost metode je torej odvisna od količine in kakovosti izolirane DNK in s tem neposredno od količine in ohranjenosti bioloških vzorcev, ki so bili poslani v preiskavo. Za forenzične vzorce je značilno, da vsebujejo velikokrat majhno količino delno razgrajene DNK, saj so biološke sledi izpostavljene zunanjim dejavnikom (kemijskim in biološkim). Na razgradnjo DNK v vzorcu sledi pa vplivamo tudi sami, s tem ko vzorec sledi neprimerno odvzamemo in/ali ga neprimerno shranimo.

Metoda prstnih odtisov DNK (angl. DNA fingerprinting), ki temelji na analizi polimorfizmov restrikcijskih fragmentov (angl. Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP), je bila zgodovinsko prva genetska identifikacijska metoda s preiskavo polimorfizmov DNK in je dodobra pretresla področje kriminalistike in sodne medicine. Razvil jo je Alec Jeffreys (Velika Britanija). Prvič je bila uporabljena na civilnem sodišču v Veliki Britaniji leta 1985, in sicer za reševanje imigracijskega primera. Kot začetek njenega znamenitega pohoda pa velja leto 1986 s primerom Enderby, ko je bil na podlagi metode prstnega odtisa DNK prijet posiljevalec in morilec dveh 15-letnih deklic (leta 1983 in 1986 v mestecu Enderby v Veliki Britaniji). Čeprav je metoda prstnih odtisov DNK individualno specifična, medtem ko profil DNK sam po sebi ne ponuja individualne specifičnosti, šele z analizo večjega števila področij STR dobimo za posameznika individualno specifičen vzorec alelov, metodo prstnih odtisov DNK danes opuščajo, ker ima precej šibkosti. Metoda prstnih odtisov DNK zahteva zelo veliko subjektivnih izkušenj, saj je razlaga rezultatov zaradi velikega števila fragmentov in slabe ločljivosti velikokrat vprašljiva, primerjava med laboratoriji ni mogoča, kot tudi ni mogoče shranjevati podatkov v obliki podatkovne baze, avtomatizacija analiz ni mogoča. Poleg navedenega je njena pomanjkljivost tudi potreba po veliki količini DNK, saj se količina, potrebna za analizo, giblje med 50 do 500 ng visoko ohranjene DNK, to je 50-krat do 500-krat več kot v primeru analize STR, zato kar iz 20 % forenzičnih vzorcev ni možna analiza z metodo RFLP. Zlasti identifikacija okostij je s to metodo skoraj v večini primerov neuspešna. Dodatna šibkost te metode je, da je čas, potreben za analizo, dolg nekaj tednov, medtem ko se analiza STR zaključi že v 1 do 2 dneh in pri tem ne zahteva uporabe radioaktivnih izotopov, kot to velja za metodo RFLP.

Metoda profiliranja DNK poteka v več korakih:

- izolacija, čiščenje in določanje koncentracije DNK v forenzičnem vzorcu (kost, zob),
- izolacija in določanje koncentracije DNK v primerjalnem vzorcu,
- ciljanje točno določenih odsekov na DNK molekuli,
- pomnoževanje določenih odsekov DNK v velikem številu,
- ločevanje pomnoženih fragmentov DNK glede na velikost in
- določanje velikosti posameznega pomnoženega fragmenta DNK iz vzorca.

Dokazovanje sorodstvenih povezav z analizo mikrosatelitov

Testi ugotavljanja sorodstvenih povezav potekajo tako, da se posamezni genetski profili primerjajo med seboj. Ugotavljajo lahko zelo različne sorodstvene povezave, vendar se analize med seboj razlikujejo glede na stopnjo sorodstvene povezanosti pogrešane osebe. Bistvo testov je, da se za vsak posamezni lokus preveri navzočnost obeh alel in se ju primerja z aleli istega področja sorodnikov. Bolj ko sta si dve osebi sorodni, več skupnih alelov imata. Tako imata mati in otrok oziroma oče in otrok 50% skupnih alelov, saj otrok podeduje polovico alelov od matere in drugo polovico od očeta. Bratje in sestre delijo med seboj le še 25% alelov.

Sistem delovanja testov ugotavljanja sorodstvenih povezav se lahko prikaže na primeru preverjanja spornega očetovstva. Pri preverjanju spornih očetovstev na posameznem lokusu očetovstvo pritrdimo v primeru, ko se pri domnevnem očetu najde enega od alelov. Če takega alela ni za posamezno preiskano področje STR, očetovstvo za posamezen lokus izključimo. Domnevnega očeta izključimo kot biološkega očeta, ko nam rezultati pokažejo izključitev vsaj na dveh analiziranih lokusih (69). Na enak način postopamo nato še za domnevno mater. Vendar mora mati vsebovati le tiste alele, ki jih nismo pripisali očetu. Zavedati se je treba, da so izključitve brezpogojne, medtem ko potrditve temeljijo na verjetnosti. Prav zato moramo biti pri izključitvah zelo previdni, ker se pri delu pojavljajo tudi proceduralne napake, ki lahko povzročijo napačno izključitev, povsem neverjetno pa je, da bi povzročile napačne potrditve. Poleg proceduralnih napak pa lahko probleme povzročijo tudi mutacije, ki so v spolnih celicah precej visoke in nam v primerih dejanskega biološkega očeta/matere pokažejo izključitev očetovstva/materinstva, ker pride do neujemanja med aleli (70). Za prepričljiv rezultat analize spornega očetovstva morajo dokazati izključitev na vsaj dveh neodvisnih področjih (pravilo dvojne izključitve). Za analize sorodstvenih povezav pa so kot primerjalni vzorci, poleg matere in očeta, primerni tudi otroci, sestre ali bratje pogrešane osebe.

Ker potrditev sorodstvene povezanosti ni dokončna, ampak je pogojena z verjetnostjo, je treba upoštevati minimalno število analiziranih področij, ki zadosti kriteriju, potrebnem, da lahko popolnoma določimo sorodstvene odnose. Tako je v ZDA podana zakonska zahteva, da mora skupna verjetnost izključitve pri določanju očetovstva presegati 99 %, da lahko očetovstvo potrdimo (39). Pri uporabi področij STR za ugotavljanje sorodstvenih povezav starši–otrok, pa je najmanjše število, ki zadosti temu kriteriju, analiza 9 področij STR. Pogoje za izračun verjetnosti pa je opravljena populacijska genetska študija področij, ki jih bomo analizirali (71–76). S pomočjo statističnih metod lahko izračunamo relativne frekvence alelov v populaciji. Na osnovi le-teh lahko določimo dva parametra: verjetnost ujemanja in diskriminacijsko moč, ki kažeta učinkovitost lokusov v analizi (77, 78). Za ocenjevanje moči genetskega dokaza je treba izračunati verjetnost, da domnevna starša (brat, sestra, otrok) nista prava starša (brat, sestra, otrok) (78, 79). Z izračunom skupne verjetnosti izključitve starševstva povemo, kakšna je zmožnost identifikacijskega testa, da kot biološke starše izključi napačno določene starše iz dane populacije. Skupna verjetnost izključitve narašča s številom anali-

ziranih področij. Izrazimo jo v odstotkih. Le-ta nam pove odstotek staršev, ki niso biološki starši in jih z metodo DNK izključimo.

Analize mtDNK

Lastnost mtDNK, da se v celicah nahaja v velikem številu kopij, je za forenzične preiskave velika prednost. Medtem ko se jedrna DNK nahaja v somatski celici le v dveh kopijah, ima po ocenitvi zreli oocit na tisoče mitohondrijev in 100.000 kopij mtDNK. V somatskih celicah je navzoča mtDNK v različnem obsegu od 200–1700 kopij (30). Ta relativno bogata navzočnost mtDNK v splošnem prispeva k visoki vsebnosti mtDNK kljub zelo razgrajenemu vzorcu in je eden glavnih vzrokov, zakaj se mtDNK analizira. Druga značilnost, ki daje večjo moč mtDNK analizam kot forenzičnemu orodju, je, da se mtDNK deduje le po materi (31). MtDNK določuje povezavo z materinimi sorodniki. Vsi sorodniki po materini strani imajo enako nukleotidno zaporedje mtDNK. Primerjave nukleotidnega zaporedja mtDNK med različnimi maternalnimi vrstami pa kažejo visoko stopnjo variabilnosti. Ta visoka stopnja variabilnosti omogoča, da postane primerjalna analiza nukleotidnega zaporedja zelo uspešna metoda za ugotavljanje sorodstvenih povezav neznanih posmrtnih ostankov s člani družine. Skupina strokovnjakov iz forenzičnega laboratorija ameriške vojske z Mitchell Hollandom in skupina iz FBI laboratorija z Bruce Budowlijem sta najuspešnejši skupini na področju analiz mtDNK (50, 51).

Analiza mtDNK se izvaja s sekvenciranjem posameznih področij (določevanjem nukleotidnega zaporedja) (80), saj njen polimorfizem v večini primerov temelji na baznih substitucijah in kratkih delecijah/insercijah. Prvo sekvenco človeške mtDNK je objavil Anderson leta 1981 (26) in rabi danes kot referenčna sekvenca za ugotavljanja polimorfizmov ne glede na vrsto populacije (58). Obe verigi mtDNK imata občutno razliko v sestavi baz, lahka veriga je bogata s pirimidinskimi bazami, težka pa s purini. Oštevilčenje baz se prične približno v sredini kontrolne regije. Zato se kontrolna regija razteza od 16.024 do 16.569 nukleotidnega zaporedja in nadalje od 1 do 576 nukleotidne pozicije. V razdobju zadnjih 15 let je intenzivno potekalo raziskovanje mitohondrijskega genoma. Analizirali so nukleotidna zaporedja med posamezniki in populacijami v obeh regijah mtDNK. V nasprotju s kodogeno regijo so deli v kontrolni regiji mtDNK med posamezniki visoko variabilni, kar je verjetno posledica zmanjšanega selekcijskega pritiska na to področje. Zaradi tega so se forenzični identifikacijski testi usmerili v analizo sekvenčne variabilnosti znotraj hipervariabilne kontrolne regije. Po obdelavi posameznih podatkov so ugotovili, da sta najbolj variabilni področji v tej regiji področji HVI in HVII. Področje HVI poteka od nukleotidne pozicije 16.024 do 16.365, medtem ko HVII od 73 do 340. Sekvenciranje temelji na tehniki PCR z uporabo fluorescentnih obarvanih oligonukleotidnih začetnikov. Le-te so izbrali tako, da omejujejo do 500 nukleotidov dolgo zaporedje. Pomnožena nukleotidna zaporedja se loči z gelsko ali kapilarno elektroforezo, določa pa se jih avtomatizirano, z uporabo posebnega instrumenta, avtomatskega sekvena-

torja (377 DNA Sequencer ali 310 Genetic Analyzer), ki vsebuje analitski računalniški program. Rezultati analiz so podani v obliki sekvenčnega elektroferograma, ki nam pove natančno zaporedje nukleotidov za posamezno analizirano področje. Avtomatizirana fluorescentna tehnologija omogoča zelo hitro, natančno in učinkovito analizo polimorfizmov DNK (81).

Dokazovanje sorodstvenih povezav z analizo mtDNK

Med razvojem celice se molekule mtDNK podvojujejo neodvisno druga od druge in niso striktno vezane na mitotično ali mejotično celično delitev, med njimi tudi ne poteka rekombinacija. Še več, replikacija mtDNK je povezana z veliko večjim številom napak kot jedrna DNK. To sta razlagi, ki ustvarjata možnost, da je populacija mtDNK, najdena v individuumu, lahko različna, z zelo različnimi variantami, ker se mitohondriji podvajajo in segregirajo neodvisno. Če bi vse variante mtDNK, navzoče v materi, prešle na hčer, bi se po nekem času nabralo toliko različnih variant, da bi postal koncept mtDNK neuporaben. Vendar ni tako, intenzivne raziskave so pokazale, da posamezniki običajno vsebujejo le en tip mtDNK, ki ga loči od ostalih materinih sorodnikov. Jasno je, da obstaja mehanizem, imenovan efekt ozkega grla (82, 83), ki omejuje raven različnih mtDNK, ki bi prehajale iz generacije v generacijo. Poznano pa je tudi, da lahko obstaja v posamezniku mešanica dveh ali več subpopulacij mtDNK, pojav je poznan kot heteroplazmija. Čeprav je napisano o heteroplazmiji v kontrolni regiji že veliko člankov, je število še vedno premajhno, da bi lahko z natančnostjo določili frekvenco, s katero se heteroplazmija pojavlja pri določeni nukleotidni poziciji. Prav gotovo smo na določeni ravni vsi heteroplazmični, vendar pa za forenzična identifikacijska testiranja včasih postane ta nivo signifikanten. S sekvenčnimi analizami je bilo ugotovljeno, da se na splošno vidna heteroplazmija v populaciji pojavi relativno z nizko frekvenco (2–8% v populaciji) in tako v večini primerov v sekvenčni analizi ni opažena. Poleg tega je znanje na dovolj visoki ravni, da jo je lahko razložiti (50, 51).

Za določanje sorodstvenih povezav moramo uporabiti empirično ovrednotenje, ki je rezultat vseh procesov v preteklosti. Ugotoviti je treba, s kakšno frekvenco je določena sekvenca (vrsta ali haplotip) mtDNK opažena v različnih populacijah. V bazo podatkov kavkaške populacije so vnesene 604 osebe, od tega je kar 451 različnih haplotipov mtDNK. Med njimi je manjše število običajnega tipa mtDNK (26 posameznikov oz. 4,3%) in večje število neobičajnih tipov mtDNK, ki se v populaciji pojavijo le enkrat (390 oseb). Za ugotavljanje primerjav med posameznimi pari pri vseh sekvencah so v laboratoriju FBI razvili program Mitosearch, s katerim se nato določi empirična verjetnost naključnega ujemanja vseh haplotipov v bazi podatkov in znaša za kavkaško populacijo 0,0037. Na osnovi le-tega se lahko predvideva, da se bosta dve naključno izbrani osebi iz populacije ujeli enkrat v 270 primerih. Verjetnost, da bo prišlo do ujemanja določene sekvence z naključnimi posamezniki, v veliki meri zavisi od relativne redkosti določenega tipa. Povprečna razlika med posamezniki v kavkaški popu-

ziranih področij. Izrazimo jo v odstotkih. Le-ta nam pove odstotek staršev, ki niso biološki starši in jih z metodo DNK izključimo.

Analize mtDNK

Lastnost mtDNK, da se v celicah nahaja v velikem številu kopij, je za forenzične preiskave velika prednost. Medtem ko se jedrna DNK nahaja v somatski celici le v dveh kopijah, ima po ocenitvi zreli oocit na tisoče mitohondrijev in 100.000 kopij mtDNK. V somatskih celicah je navzoča mtDNK v različnem obsegu od 200–1700 kopij (30). Ta relativno bogata navzočnost mtDNK v splošnem prispeva k visoki vsebnosti mtDNK kljub zelo razgrajenemu vzorcu in je eden glavnih vzrokov, zakaj se mtDNK analizira. Druga značilnost, ki daje večjo moč mtDNK analizam kot forenzičnemu orodju, je, da se mtDNK deduje le po materi (31). MtDNK določuje povezavo z materinimi sorodniki. Vsi sorodniki po materini strani imajo enako nukleotidno zaporedje mtDNK. Primerjave nukleotidnega zaporedja mtDNK med različnimi maternalnimi vrstami pa kažejo visoko stopnjo variabilnosti. Ta visoka stopnja variabilnosti omogoča, da postane primerjalna analiza nukleotidnega zaporedja zelo uspešna metoda za ugotavljanje sorodstvenih povezav neznanih posmrtnih ostankov s člani družine. Skupina strokovnjakov iz forenzičnega laboratorija ameriške vojske z Mitchell Hollandom in skupina iz FBI laboratorija z Bruce Budowlijem sta najuspešnejši skupini na področju analiz mtDNK (50, 51).

Analiza mtDNK se izvaja s sekvenciranjem posameznih področij (določevanjem nukleotidnega zaporedja) (80), saj njen polimorfizem v večini primerov temelji na baznih substitucijah in kratkih delecijah/insercijah. Prvo sekvenco človeške mtDNK je objavil Anderson leta 1981 (26) in rabi danes kot referenčna sekvenca za ugotavljanja polimorfizmov ne glede na vrsto populacije (58). Obe verigi mtDNK imata občutno razliko v sestavi baz, lahka veriga je bogata s pirimidinskimi bazami, težka pa s purini. Oštevilčenje baz se prične približno v sredini kontrolne regije. Zato se kontrolna regija razteza od 16.024 do 16.569 nukleotidnega zaporedja in nadalje od 1 do 576 nukleotidne pozicije. V razdobju zadnjih 15 let je intenzivno potekalo raziskovanje mitohondrijskega genoma. Analizirali so nukleotidna zaporedja med posamezniki in populacijami v obeh regijah mtDNK. V nasprotju s kodogeno regijo so deli v kontrolni regiji mtDNK med posamezniki visoko variabilni, kar je verjetno posledica zmanjšanega selekcijskega pritiska na to področje. Zaradi tega so se forenzični identifikacijski testi usmerili v analizo sekvenčne variabilnosti znotraj hipervariabilne kontrolne regije. Po obdelavi posameznih podatkov so ugotovili, da sta najbolj variabilni področji v tej regiji področji HVI in HVII. Področje HVI poteka od nukleotidne pozicije 16.024 do 16.365, medtem ko HVII od 73 do 340. Sekvenciranje temelji na tehniki PCR z uporabo fluorescentnih obarvanih oligonukleotidnih začetnikov. Le-te so izbrali tako, da omejujejo do 500 nukleotidov dolgo zaporedje. Pomnožena nukleotidna zaporedja se loči z gelsko ali kapilarno elektroforezo, določa pa se jih avtomatizirano, z uporabo posebnega instrumenta, avtomatskega sekvena-

torja (377 DNA Sequencer ali 310 Genetic Analyzer), ki vsebuje analitski računalniški program. Rezultati analiz so podani v obliki sekvenčnega elektroferograma, ki nam pove natančno zaporedje nukleotidov za posamezno analizirano področje. Avtomatizirana fluorescentna tehnologija omogoča zelo hitro, natančno in učinkovito analizo polimorfizmov DNK (81).

Dokazovanje sorodstvenih povezav z analizo mtDNK

Med razvojem celice se molekule mtDNK podvojujejo neodvisno druga od druge in niso striktno vezane na mitotično ali mejotično celično delitev, med njimi tudi ne poteka rekombinacija. Še več, replikacija mtDNK je povezana z veliko večjim številom napak kot jedrna DNK. To sta razlagi, ki ustvarjata možnost, da je populacija mtDNK, najdena v individuumu, lahko različna, z zelo različnimi variantami, ker se mitohondriji podvajajo in segregirajo neodvisno. Če bi vse variante mtDNK, navzoče v materi, prešle na hčer, bi se po nekem času nabralo toliko različnih variant, da bi postal koncept mtDNK neuporaben. Vendar ni tako, intenzivne raziskave so pokazale, da posamezniki običajno vsebujejo le en tip mtDNK, ki ga loči od ostalih materinih sorodnikov. Jasno je, da obstaja mehanizem, imenovan efekt ozkega grla (82, 83), ki omejuje raven različnih mtDNK, ki bi prehajale iz generacije v generacijo. Poznano pa je tudi, da lahko obstaja v posamezniku mešanica dveh ali več subpopulacij mtDNK, pojav je poznan kot heteroplazmija. Čeprav je napisano o heteroplazmiji v kontrolni regiji že veliko člankov, je število še vedno premajhno, da bi lahko z natančnostjo določili frekvenco, s katero se heteroplazmija pojavlja pri določeni nukleotidni poziciji. Prav gotovo smo na določeni ravni vsi heteroplazmični, vendar pa za forenzična identifikacijska testiranja včasih postane ta nivo signifikanten. S sekvenčnimi analizami je bilo ugotovljeno, da se na splošno vidna heteroplazmija v populaciji pojavi relativno z nizko frekvenco (2–8% v populaciji) in tako v večini primerov v sekvenčni analizi ni opažena. Poleg tega je znanje na dovolj visoki ravni, da jo je lahko razložiti (50, 51).

Za določanje sorodstvenih povezav moramo uporabiti empirično ovrednotenje, ki je rezultat vseh procesov v preteklosti. Ugotoviti je treba, s kakšno frekvenco je določena sekvenca (vrsta ali haplotip) mtDNK opažena v različnih populacijah. V bazo podatkov kavkaške populacije so vnesene 604 osebe, od tega je kar 451 različnih haplotipov mtDNK. Med njimi je manjše število običajnega tipa mtDNK (26 posameznikov oz. 4,3%) in večje število neobičajnih tipov mtDNK, ki se v populaciji pojavijo le enkrat (390 oseb). Za ugotavljanje primerjav med posameznimi pari pri vseh sekvencah so v laboratoriju FBI razvili program Mitosearch, s katerim se nato določi empirična verjetnost naključnega ujemanja vseh haplotipov v bazi podatkov in znaša za kavkaško populacijo 0,0037. Na osnovi le-tega se lahko predvideva, da se bosta dve naključno izbrani osebi iz populacije ujeli enkrat v 270 primerih. Verjetnost, da bo prišlo do ujemanja določene sekvence z naključnimi posamezniki, v veliki meri zavisi od relativne redkosti določenega tipa. Povprečna razlika med posamezniki v kavkaški popu-

laciji je 8 nukleotidov. Z naraščanjem baze podatkov o poznanih vrstah mtDNK narašča tudi njena raznovrstnost, s tem pa tudi narašča moč testiranja mtDNK, saj se je pokazalo, da je v populaciji manjše število običajne vrste mtDNK. Ko dodajo v bazo podatkov nove sekvence, ostane večina sekvenc v njej še naprej enkratnih, pri tem pa se njihova pogostnost na populacijo zniža.

Moč ujemanja

Ko se prične sekvenčna tipizacija aplicirati kot identifikacijski genetski test, je jasno, da je njen namen odgovoriti na dve odvisni vprašanji:

– ali se lahko s sekvenčno primerjavo osebo izloči kot možen vir spornega vzorca,

– in, kaj nam vključitev pove o možnosti, da je oseba dejansko vir spornega vzorca.

Če je odgovor na prvo vprašanje pritrdilen, potem je rezultat izključitve izjemnega pomena, saj postane s tem uporabnost mtDNK analiz jasna in utemeljena. Kolikor pa je posameznik vključen kot potencialni vir spornega forenzičnega vzorca, se takoj pojavi drugo vprašanje, teža dokaza, saj lahko vključitev pomeni karkoli (v primeru metanja kovanca je možnost med cifro in glavo 50 % : 50 %, kar pomeni pri forenzičnih preiskavah neuporabnost analize). Dolžnost forenzičnih strokovnjakov je, da utemeljijo pomen vključitev ali ujemanj mtDNK. V splošnem je teža ujemanj v sekvenci mtDNK odvisna od primera do primera in od vrste mtDNK, ki je vključena v primer. V samo omejenih vrstah okoliščin je ujemanje mtDNK mišljeno kot dokončen dokaz identifikacije (50, 51). Za sedaj se to lahko zgodi le v primerih, ko je populacija, iz katere lahko izvira potencialni vir, zaprta, omejena le na določeno skupino posameznikov. Npr. v letalski nesreči, če pride v analizi do ujemanj primerjalnega vzorca z osebo, ki je bila na letalu in se razlikuje od vseh ostalih, potem se ujemanje z najdenimi ostanki smatra kot pozitivna identifikacija. Identifikacija v tem primeru ne temelji na statistiki, pač pa na procesu eliminacije, ki je odvisen od dejstva, da vzorec lahko izvira le od znane skupine ljudi. Identifikacija Michaela J. Blassieja (4), katerega skeletni ostanki so bili zakopani v grobnici 14 let, kot posmrtni ostanki neznanega ameriškega vojaka, padlega v Vietnamu, je primer, ko je bila uporabljena analiza mtDNK, da razloči med omejeno skupino različnih porekel (rodov). Iz grobnice so vzeli 6 skeletnih ostankov – nadlahtnico, medenično kost in 4 rebra, da bi na njih opravili analizo mtDNK in rezultate primerjali z referenčnimi vzorci sedmih družin, ki so tudi izgubile svoje bližnje v istem času in istem območju v vietnamski vojni. Ko so sekvenco mtDNK, dobljeno iz skeletnih ostankov neznanega ameriškega vojaka, primerjali s haplotipi sedmih družin, je prišlo do ujemanja le pri Blassijevi družini in pri nobeni drugi od ostalih 6 družin. Ta informacija, skupaj z drugimi okoliščinami (da je bil Michael Blassie ameriški vojak, ki je izgubil življenje v vietnamski vojni) je odločilno vplivala, da so bili skeletni ostanki identificirani kot Michael J. Blassie. Ključnega pomena je tu tudi delovanje CILHI (Central Identification Laboratory in Hawaii), ki opravlja druge identifikacije na osnovi tradicionalnih metod, antropološke in zobne primerjave itd., in v primerih, ko le-te

niso dovolj, se zahteva še dodatna informacija z analizo mtDNK. Do februarja 1999 je bilo v ta namen analiziranih več kot 125 mtDNK.

Bolj običajno pa je, da se testiranje mtDNK vključuje v primere, ko populacija, iz katere izvira potencialni vir, ni zaprta oziroma okarakterizirana, npr. pri kaznivih dejanjih (50, 51). Takrat ne moremo podati dokončne identifikacije in moramo oceniti relativno pomembnost ali potencial izključitve (ujemanja). Ta izjava temelji na indikacijah o relativni frekvenci določenega tipa mtDNK v populaciji oz. kakšna je verjetnost, da bo prišlo do ujemanja med naključnim posameznikom in določenim tipom mtDNK. Najenostavnejše sporočilo, ki ga je mogoče ugotoviti glede na redkost mtDNK sekvence, je ugotovitev, kolikokrat je bila taka sekvenca opažena v različnih bazah podatkov. To se označuje kot metodo štetja (vendar s tem ni mišljena ocena frekvenc) brez nadaljnjih interpretacij, saj je metoda štetja kot ocenitve pogostnosti določenega tipa mtDNK šibka metoda.

Če se pri analizah pojavi heteroplazmija, je treba opraviti interpretacijo še bolj natančno in analizirati sporni vzorec z večjim številom primerjalnih vzorcev, kar ponavadi olajša razlago opaženih razlik. Če mtDNK sekvenci vzorcev v primerjavi kažeta heteroplazmijo (obe sekvenci sta opaženi v vsakem vzorcu), potem se vzorca ne moreta izključevati. Če vzorca med seboj delita skupno sekvenco mtDNK (en vzorec je homoplazmičen, drugi je heteroplazmičen, vendar je ena od sekvenc enaka kot pri homoplazmičnem vzorcu), potem se ga zopet ne more izključiti. Če sta oba homoplazmična, pa se ločita le v enem nukleotidu, je potrebna nadaljnja raziskava. Če se pri tem ne razreši, je rezultat neodločen. Ko primerjalnega vzorca ne moremo izključiti kot potencialnega vira, je željeno, da se poda redkost vrste mtDNK. Le-ta se poda s številom, kolikokrat je bila določena sekvenca (tip) vidna v bazi podatkov.

Sklep

Največji izziv sodne medicine in forenzičnih preiskav postaja prav identifikacija žrtev množičnih nesreč, kot so letalske nesreče, potresi, požari, in žrtev množičnih pobojev kot posledice vojaških konfliktov ali diktatorskega režima, ki so ostale neodkrite mnogo let. Pozitivna identifikacija človeških posmrtnih ostankov se primarno določa na osnovi daktiloskopskih, odontoloških in antropoloških analiz. Vendar v primerih, ko je mehko tkivo že povsem razgrajeno ali ko primerjalna analiza zobnega statusa ali skeleta ni mogoča, ko so na voljo le še delni skeletni ostanki, deli okostij z nedoločljivimi značilnostmi ter zelo razgrajeni, izsušeni in zогleneli človeški ostanki, so podatki, dobljeni iz teh sledi, preskromni za pozitivno identifikacijo. Genetski identifikacijski testi s preiskavo polimorfizmov DNK pa v večini teh primerov omogočajo identifikacijo.

Mnogo skupin je uspešno izvedlo identifikacijske DNK teste tako z analizo mikrosatelitov jedrne DNK kot tudi nukleotidnega zaporedja kontrolne regije mitohondrijskega genoma. Npr. pri identifikaciji posmrtnih ostankov cesarske družine Romanov, Josefa Mengeleja, neznanega ameriškega vojaka, padlega v Vietnamu, določitve vseh 229 umrlih v letalski nesreči švicarskega letala, ki je

laciji je 8 nukleotidov. Z naraščanjem baze podatkov o poznanih vrstah mtDNK narašča tudi njena raznovrstnost, s tem pa tudi narašča moč testiranja mtDNK, saj se je pokazalo, da je v populaciji manjše število običajne vrste mtDNK. Ko dodajo v bazo podatkov nove sekvence, ostane večina sekvenc v njej še naprej enkratnih, pri tem pa se njihova pogostnost na populacijo zniža.

Moč ujemanja

Ko se prične sekvenčna tipizacija aplicirati kot identifikacijski genetski test, je jasno, da je njen namen odgovoriti na dve odvisni vprašanji:

– ali se lahko s sekvenčno primerjavo osebo izloči kot možen vir spornega vzorca,

– in, kaj nam vključitev pove o možnosti, da je oseba dejansko vir spornega vzorca.

Če je odgovor na prvo vprašanje pritrdilen, potem je rezultat izključitve izjemnega pomena, saj postane s tem uporabnost mtDNK analiz jasna in utemeljena. Kolikor pa je posameznik vključen kot potencialni vir spornega forenzičnega vzorca, se takoj pojavi drugo vprašanje, teža dokaza, saj lahko vključitev pomeni karkoli (v primeru metanja kovanca je možnost med cifro in glavo 50 % : 50 %, kar pomeni pri forenzičnih preiskavah neuporabnost analize). Dolžnost forenzičnih strokovnjakov je, da utemeljijo pomen vključitev ali ujemanj mtDNK. V splošnem je teža ujemanj v sekvenci mtDNK odvisna od primera do primera in od vrste mtDNK, ki je vključena v primer. V samo omejenih vrstah okoliščin je ujemanje mtDNK mišljeno kot dokončen dokaz identifikacije (50, 51). Za sedaj se to lahko zgodi le v primerih, ko je populacija, iz katere lahko izvira potencialni vir, zaprta, omejena le na določeno skupino posameznikov. Npr. v letalski nesreči, če pride v analizi do ujemanj primerjalnega vzorca z osebo, ki je bila na letalu in se razlikuje od vseh ostalih, potem se ujemanje z najdenimi ostanki smatra kot pozitivna identifikacija. Identifikacija v tem primeru ne temelji na statistiki, pač pa na procesu eliminacije, ki je odvisen od dejstva, da vzorec lahko izvira le od znane skupine ljudi. Identifikacija Michaela J. Blassieja (4), katerega skeletni ostanki so bili zakopani v grobnici 14 let, kot posmrtni ostanki neznanega ameriškega vojaka, padlega v Vietnamu, je primer, ko je bila uporabljena analiza mtDNK, da razloči med omejeno skupino različnih porekel (rodov). Iz grobnice so vzeli 6 skeletnih ostankov – nadlahtnico, medenično kost in 4 rebra, da bi na njih opravili analizo mtDNK in rezultate primerjali z referenčnimi vzorci sedmih družin, ki so tudi izgubile svoje bližnje v istem času in istem območju v vietnamski vojni. Ko so sekvenco mtDNK, dobljeno iz skeletnih ostankov neznanega ameriškega vojaka, primerjali s haplotipi sedmih družin, je prišlo do ujemanja le pri Blassievi družini in pri nobeni drugi od ostalih 6 družin. Ta informacija, skupaj z drugimi okoliščinami (da je bil Michael Blassie ameriški vojak, ki je izgubil življenje v vietnamski vojni) je odločilno vplivala, da so bili skeletni ostanki identificirani kot Michael J. Blassie. Ključnega pomena je tu tudi delovanje CILHI (Central Identification Laboratory in Hawaii), ki opravlja druge identifikacije na osnovi tradicionalnih metod, antropološke in zobne primerjave itd., in v primerih, ko le-te

niso dovolj, se zahteva še dodatna informacija z analizo mtDNK. Do februarja 1999 je bilo v ta namen analiziranih več kot 125 mtDNK.

Bolj običajno pa je, da se testiranje mtDNK vključuje v primere, ko populacija, iz katere izvira potencialni vir, ni zaprta oziroma okarakterizirana, npr. pri kaznivih dejanjih (50, 51). Takrat ne moremo podati dokončne identifikacije in moramo oceniti relativno pomembnost ali potencial izključitve (ujemanja). Ta izjava temelji na indikacijah o relativni frekvenci določenega tipa mtDNK v populaciji oz. kakšna je verjetnost, da bo prišlo do ujemanja med naključnim posameznikom in določenim tipom mtDNK. Najenostavnejše sporočilo, ki ga je mogoče ugotoviti glede na redkost mtDNK sekvence, je ugotovitev, kolikokrat je bila taka sekvenca opažena v različnih bazah podatkov. To se označuje kot metodo štetja (vendar s tem ni mišljena ocena frekvenc) brez nadaljnjih interpretacij, saj je metoda štetja kot ocenitve pogostnosti določenega tipa mtDNK šibka metoda.

Če se pri analizah pojavi heteroplazmija, je treba opraviti interpretacijo še bolj natančno in analizirati sporni vzorec z večjim številom primerjalnih vzorcev, kar ponavadi olajša razlago opaženih razlik. Če mtDNK sekvenci vzorcev v primerjavi kažeta heteroplazmijo (obe sekvenci sta opaženi v vsakem vzorcu), potem se vzorca ne moreta izključevati. Če vzorca med seboj delita skupno sekvenco mtDNK (en vzorec je homoplazmičen, drugi je heteroplazmičen, vendar je ena od sekvenc enaka kot pri homoplazmičnem vzorcu), potem se ga zopet ne more izključiti. Če sta oba homoplazmična, pa se ločita le v enem nukleotidu, je potrebna nadaljnja raziskava. Če se pri tem ne razreši, je rezultat neodločen. Ko primerjalnega vzorca ne moremo izključiti kot potencialnega vira, je željeno, da se poda redkost vrste mtDNK. Le-ta se poda s številom, kolikokrat je bila določena sekvenca (tip) vidna v bazi podatkov.

Sklep

Največji izziv sodne medicine in forenzičnih preiskav postaja prav identifikacija žrtev množičnih nesreč, kot so letalske nesreče, potresi, požari, in žrtev množičnih pobojev kot posledice vojaških konfliktov ali diktatorskega režima, ki so ostale neodkrite mnogo let. Pozitivna identifikacija človeških posmrtnih ostankov se primarno določa na osnovi daktiloskopskih, odontoloških in antropoloških analiz. Vendar v primerih, ko je mehko tkivo že povsem razgrajeno ali ko primerjalna analiza zobnega statusa ali skeleta ni mogoča, ko so na voljo le še delni skeletni ostanki, deli okostij z nedoločljivimi značilnostmi ter zelo razgrajeni, izsušeni in zогleneli človeški ostanki, so podatki, dobljeni iz teh sledi, preskromni za pozitivno identifikacijo. Genetski identifikacijski testi s preiskavo polimorfizmov DNK pa v večini teh primerov omogočajo identifikacijo.

Mnogo skupin je uspešno izvedlo identifikacijske DNK teste tako z analizo mikrosatelitov jedrne DNK kot tudi nukleotidnega zaporedja kontrolne regije mitohondrijskega genoma. Npr. pri identifikaciji posmrtnih ostankov cesarske družine Romanov, Josefa Mengeleja, neznanega ameriškega vojaka, padlega v Vietnamu, določitve vseh 229 umrlih v letalski nesreči švicarskega letala, ki je

padlo v morje pri Novi Škotski itd. Metode za uspešno izolacijo jedrne kot tudi mitohondrijske DNK iz zelo starih kosti in zob so določene. Molekularne metode, ki se uporabljajo v forenzičnih identifikacijskih testih, so standardizirane. Obenem pa sta skupini EDNAP in TWGDNA uzakonili temeljna navodila za interpretacijo analiz polimorfizmov mikrosatelitov jedrne DNK kot tudi nuleotidnega zaporedja mtDNK.

Dejstvo je, da analiza DNK ostaja v nekaterih primerih, kot je identifikacija posmrtnih človeških ostankov v množičnih grobiščih ali pri množičnih nesrečah, edina možnost. Izjemna učinkovitost analiz DNK nam daje upanje, da bo skupaj s tradicionalnimi metodami lahko povečala verjetnost pozitivne identifikacije zelo težkih primerov, če so na voljo primerni sorodniki. Analize mtDNK se uspešno uporabljajo za določitev sorodstvenih povezav predvsem takrat, ko so žrtev in sorodniki ločeni nekaj generacij, medtem ko analize mikrosatelitov omogočajo zanesljivo določitev bližnjih sorodstvenih povezav kot so starši–otrok, bratje–sestre.

Dokazi, zbrani na podlagi forenzičnih preiskav, so pomembni za ugotavljanje sorodstvenih povezav in prepoznavo pogrešanih. Za vsakega posameznika je zelo boleče, da ne ve, kje leži ljubljeni. Prav tako pa je tudi za državo pomembno, da ve, kaj se je zgodilo z njenimi vojaki. Do leta 1992 je bilo med različnimi vojaškimi misijami več kot 86.000 Američanov pogrešanih. Zato je vlada ZDA vložila veliko truda, da bi razrešila usodo vsakega pogrešanega ameriškega državljana. Na tisoče posmrtnih ostankov so odkrili in poslali v laboratorij CILHI, ki izvaja identifikacije na osnovi tradicionalnih metod (antropoloških in odontoloških). Njemu v pomoč pa so leta 1991 ustanovili še AFDIL, ki za identifikacijo uporablja analize DNK (predvsem mtDNK).

Prav tako so se po vsem svetu ustanovile različne mednarodne forenzične skupine, sestavljene iz antropologov, patologov, obducentov in DNK forenzičnih strokovnjakov, ki delujejo na območju vojaških konfliktov (Ruanda, Kosovo, Bosna, Gvatemala Argentina), da zberejo čim več podatkov, pomagajo pri prepoznavi oseb v različnih množičnih grobiščih ter sodiščem pri kazenskem preganjanju posameznikov za zločine proti človeštvu. Eno novejših skupin je ustanovilo Mednarodno združenje za pogrešane osebe (International Commission on Missing Persons) za identifikacijo oseb, pogrešanih v zadnji vojni v Bosni s sedežem v Sarajevu. V bližnji prihodnosti nameravajo opraviti 120.000 mtDNK analiz, kar je več, kot jih obsega celotna svetovna baza podatkov.

Literatura

1. Gill P., Ivanov P. L., Kimpton C., Piercy R., Benson N., Tully G., Evett I., Hagelberg E., Sullivan K.: Identification of the remains of Romanov family by DNA analysis. *Nature genetics* 6:130;1995.
2. Gill P., Kimpton C., Alison-Greiner R., Sullivan K., Stoneking M., Melton T., Nott J., Barritt S., Roby R., Holland M., Weedn V.: Establishing the identity of Anna Anderson Manahan. *Nature genetics* 9:9;1995.
3. Ivanov P. L., Wadhams M. J., Roby R., Holland M., Weedn V., Parsons T.: Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the suthenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nature genetics* 12:339;1996.
4. Holland M., Fisher D. L., Mitchell L. G., Rodriguez W. C., Canik J. J., Merril C. R., Weedn VW: Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: Identification of remains from the Vietnam War. *J Forensic Sciences* 38:542;1993.
5. Jeffreys, A. J.: DNA typing: approaches and applications. *J of Forensic Science Society* 33: 204; 1993.
6. Reynolds R., Sensabaugh G., Blake, E.: Analysis of genetic markers in forensic DNA samples using polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry* 63: 2; 1991.
7. Krogman, W. M. and Iscan, M. Y.: The human skeleton in forensic medicine. 2nd Ed. Charles C. Thomas, Springfield, 1986.
8. Boles TC, Snow CC, Stover E: Forensic DNA testing on skeletal remains from mass graves: a pilot project in Guatemala. *J Forensic Sciences* 40:349;1995.
9. Corach D., Sala A., Penacino G., Iannucci N., Bernardi P., Doretti M., Fondebriber L., Ginarte A., Inchaurregui A., Somigliana C., Turner S., Hagelberg E.: Additional aproaches to DNA typing skeletal remains: the search for missing persons killed during the last dictatorship in Argentina. *Electrophoresis* 18:1608;1997.
10. Zajec M., Kozina F., Dejak F. Ušli so smrti. Poročilo treh rešencev iz množičnega groba v Kočevskem Rogu. Ed. Mohorjeva založba, Celovec, 1998.
11. Lee H., Pagliaro E., Berka K., Folk N., Anderson D., Ruano G., Keith T., Phipps P., Herrin G., Garner D., Gaensslen R.: genetic markers in human bone: I.deoxyribonucleic acid (DNA) analysis. *J Forensic Sciences* 36:320;1991.
12. Perry WL, Bass W., Riggsby S., Sirotkin K.: The autodegradation of deoxyribonucelic acid (DNA) in human rib bone and its relationship to time interval since death. *J Forensic Sciences* 33:144;1988.
13. Hochmeister M., Budowle B., Borer U., Eggmann U., Comey C., Dirnhofer R.: Typing of deoxyribonucelic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. *J Forensic Sciences* 36:1649;1991.
14. Frank WE, Llewellyn MS: A time course study on STR profiles derived from human remains. *Proceedings AAFS, Orlando, FL, February 15-20, 1999.*
15. Holland M., Fisher DL, Roby R., Ruderman J., Bryson C., Weedn VW: Mitochondrial DNA sequence analysis of human remains. *Crime Lab Digest* 22:109;1995.

padlo v morje pri Novi Škotski itd. Metode za uspešno izolacijo jedrne kot tudi mitohondrijske DNK iz zelo starih kosti in zob so določene. Molekularne metode, ki se uporabljajo v forenzičnih identifikacijskih testih, so standardizirane. Obenem pa sta skupini EDNAP in TWGDNA uzakonili temeljna navodila za interpretacijo analiz polimorfizmov mikrosatelitov jedrne DNK kot tudi nuleotidnega zaporedja mtDNK.

Dejstvo je, da analiza DNK ostaja v nekaterih primerih, kot je identifikacija posmrtnih človeških ostankov v množičnih grobiščih ali pri množičnih nesrečah, edina možnost. Izjemna učinkovitost analiz DNK nam daje upanje, da bo skupaj s tradicionalnimi metodami lahko povečala verjetnost pozitivne identifikacije zelo težkih primerov, če so na voljo primerni sorodniki. Analize mtDNK se uspešno uporabljajo za določitev sorodstvenih povezav predvsem takrat, ko so žrtev in sorodniki ločeni nekaj generacij, medtem ko analize mikrosatelitov omogočajo zanesljivo določitev bližnjih sorodstvenih povezav kot so starši–otrok, bratje–sestre.

Dokazi, zbrani na podlagi forenzičnih preiskav, so pomembni za ugotavljanje sorodstvenih povezav in prepoznavo pogrešanih. Za vsakega posameznika je zelo boleče, da ne ve, kje leži ljubljeni. Prav tako pa je tudi za državo pomembno, da ve, kaj se je zgodilo z njenimi vojaki. Do leta 1992 je bilo med različnimi vojaškimi misijami več kot 86.000 Američanov pogrešanih. Zato je vlada ZDA vložila veliko truda, da bi razrešila usodo vsakega pogrešanega ameriškega državljana. Na tisoče posmrtnih ostankov so odkrili in poslali v laboratorij CILHI, ki izvaja identifikacije na osnovi tradicionalnih metod (antropoloških in odontoloških). Njemu v pomoč pa so leta 1991 ustanovili še AFDIL, ki za identifikacijo uporablja analize DNK (predvsem mtDNK).

Prav tako so se po vsem svetu ustanovile različne mednarodne forenzične skupine, sestavljene iz antropologov, patologov, obducentov in DNK forenzičnih strokovnjakov, ki delujejo na območju vojaških konfliktov (Ruanda, Kosovo, Bosna, Gvatemala Argentina), da zberejo čim več podatkov, pomagajo pri prepoznavi oseb v različnih množičnih grobiščih ter sodiščem pri kazenskem preganjanju posameznikov za zločine proti človeštvu. Eno novejših skupin je ustanovilo Mednarodno združenje za pogrešane osebe (International Commission on Missing Persons) za identifikacijo oseb, pogrešanih v zadnji vojni v Bosni s sedežem v Sarajevu. V bližnji prihodnosti nameravajo opraviti 120.000 mtDNK analiz, kar je več, kot jih obsega celotna svetovna baza podatkov.

Literatura

1. Gill P., Ivanov P. L., Kimpton C., Piercy R., Benson N., Tully G., Evett I., Hagelberg E., Sullivan K.: Identification of the remains of Romanov family by DNA analysis. *Nature genetics* 6:130;1995.
2. Gill P., Kimpton C., Alison-Greiner R., Sullivan K., Stoneking M., Melton T., Nott J., Barritt S., Roby R., Holland M., Weedn V.: Establishing the identity of Anna Anderson Manahan. *Nature genetics* 9:9;1995.
3. Ivanov P. L., Wadhams M. J., Roby R., Holland M., Weedn V., Parsons T.: Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the suthenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nature genetics* 12:339;1996.
4. Holland M., Fisher D. L., Mitchell L. G., Rodriguez W. C., Canik J. J., Merril C. R., Weedn VW: Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: Identification of remains from the Vietnam War. *J Forensic Sciences* 38:542;1993.
5. Jeffreys, A. J.: DNA typing: approaches and applications. *J of Forensic Science Society* 33: 204; 1993.
6. Reynolds R., Sensabaugh G., Blake, E.: Analysis of genetic markers in forensic DNA samples using polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry* 63: 2; 1991.
7. Krogman, W. M. and Iscan, M. Y.: The human skeleton in forensic medicine. 2nd Ed. Charles C. Thomas, Springfield, 1986.
8. Boles TC, Snow CC, Stover E: Forensic DNA testing on skeletal remains from mass graves: a pilot project in Guatemala. *J Forensic Sciences* 40:349;1995.
9. Corach D., Sala A., Penacino G., Iannucci N., Bernardi P., Doretti M., Fondebriider L., Ginarte A., Inchaurregui A., Somigliana C., Turner S., Hagelberg E.: Additional aproaches to DNA typing skeletal remains: the search for missing persons killed during the last dictatorship in Argentina. *Electrophoresis* 18:1608;1997.
10. Zajec M., Kozina F., Dejak F. Ušli so smrti. Poročilo treh rešencev iz množičnega groba v Kočevskem Rogu. Ed. Mohorjeva založba, Celovec, 1998.
11. Lee H., Pagliaro E., Berka K., Folk N., Anderson D., Ruano G., Keith T., Phipps P., Herrin G., Garner D., Gaensslen R.: genetic markers in human bone: I.deoxyribonucleic acid (DNA) analysis. *J Forensic Sciences* 36:320;1991.
12. Perry WL, Bass W., Riggsby S., Sirotkin K.: The autodegradation of deoxyribonucelic acid (DNA) in human rib bone and its relationship to time interval since death. *J Forensic Sciences* 33:144;1988.
13. Hochmeister M., Budowle B., Borer U., Eggmann U., Comey C., Dirnhofer R.: Typing of deoxyribonucelic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. *J Forensic Sciences* 36:1649;1991.
14. Frank WE, Llewellyn MS: A time course study on STR profiles derived from human remains. *Proceedings AAFS, Orlando, FL, February 15-20, 1999.*
15. Holland M., Fisher DL, Roby R., Ruderman J., Bryson C., Weedn VW: Mitochondrial DNA sequence analysis of human remains. *Crime Lab Digest* 22:109;1995.

16. Sullivan KM, Hopgood R., Gill P.: Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA. *Int J Leg Med* 105;83;1992.

17. Lutz S., Weisser HJ, Heizmann J., Pollak S.: mtDNA as a tool for identification of human remains – Identification using mtDNA. *Int J Leg Med* 109;205;1996.

18. Budowle, B., Adames, D. E., Comey, C. T., and Meril, C. R.: Mitochondrial DNA: A possible genetic material for forensic analysis. *DNA and Other Polymorphisms in Forensic Science. C. H. Lee and R. E. Gaensslen, Ed., Year Book Medical Publisher, Chicago, 76; 1990.*

19. Bogenhagen D, Clayton DA: The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and HeLa cells: quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem* 249;7991;1980.

20. Giles, R., Blanc, H., Cann, H. M. and Wallaces, D. C.: Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *PNAS USA* 77; 6715; 1980.

21. Jeffreys AJ, Allen MJ, Hagelberg E, Sonneberg A. Identification on the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. *For Sci Int* 56;65;1992.

22. Hagelberg, E., Gray, I. C., and Jeffreys, A. J.: Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 352: 427; 1991.

23. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, Watson, J. D.: Molecular biology of the cell. 3rd Ed., *Garland Publishing, New York, 1994.*

24. Vogel, F. and Motulsky, A. G.: Human genetics – problems and approaches. 3rd Ed. *Springer-Verlag, Berlin, 1997.*

25. Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M.: Recombinant DNA. 2nd Ed. *Scientific American Books, New York, 1992.*

26. Anderson S, Bankier A, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich D, Roe B, Sanger F, Schreier P, Smith A, Standen R, Young I: Sequence and organisation of human mitochondrial genome. *Nature* 290;457; 1981.

27. Brown MD, Wallace DC. Molecular basis of mitochondrial DNA disease. *J Bioenerg Biomembranes* 26;273;1994.

28. Parson W, Parson T, Scheithauer R, Holland M: Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial D-loop sequences: Application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. *Int J Leg Med* 111;124;1998.

29. Budowle B, Wilson M, Dizinno J, Stauffer C, Fasano M, Holland M, Monson K: Mitochondrial DNA regions HVI and HVII population data. *Forensic Sci Int*; 103: 23; 1999.

30. Robin ED, Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondrial per cell in mammalian cells. *J Cell Phys* 136: 507;1988.

31. Case, J. T. and Wallace, D. C.: Maternal inheritance of mitochondrial DNA polymorphisms in cultured human fibroblast. *Somatic Cell Genetics* 7: 103; 1981

32. Brown, W. M., Prager, E. M., Wang, A. and Wilson, A. C.: Mitochondrial sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J Mol Biol* 18: 225; 1982.

33. Cann, R. L., Stoneking, M., and Wilson, A. C.: Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325: 31; 1987.

34. Horai S, Hayasaka K: intraspecific nucleotide sequence difference in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 46;828; 1990.
35. Handt O, Meyer S, von Haessler A: Compilation of human mtDNA control region sequences. *Nuc Acids Res* 26; 126; 1998.
36. Parsons T, Muniec D, Sullivan K, Woodyatt N, Alliston-Greiner R, Wilson M, Berry D, Holland K, Weedn V, Gill P, Holland M: A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nature genetics* 15:363;1997
37. Piercy R, Sullivan KM, Benson N, Gill P: The application of mtDNA typing to the study of white Caucasian genetic identification. *Int J Leg Med* 106;85;1993.
38. Aquadro CF, Greenberg BD: Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequence from seven individuals. *Genetics* 103; 287;1983.
39. Hammond H, Jin L, Zhong Y, Caskey CT, Chakraborty R: Evaluation of 13 short repeat loci for use in personal identification applications. *Am J Hum Genet* 55;175;1994.
40. Santos S, Budowle B, Smerick JB, Keys KM, Moretti TR. Portuguese population data on the six short tandem repeat loci CSF1PO, TPOX, THO1, D3S1358, VWA and FGA. *Forensic Sci Int* 1996; 83: 229–235.
41. Garofano L, Pizzamiglio M, Vecchio C, Lago G, Floris T, D Errico G, Brembilla G, Romano A, Budowle B. Italian population data on thirteen short tandem repeat loci HUMTHO1, D21S11, D18S51, HUMVWAFA31, HUMFIB-RA, D8S1179, HUMTPOX, HUMCSF1PO, D16S539, D7S20, D13S317, D5S818, D3S1358. *Forensic Sci Int* 1998; 97: 53–60.
42. Entrala C, Lorente M, Lorente JA, Alvarey JC, Moretti T, Budowle B, Villanueva E. Fluorescent multiplex analysis of nine STR loci Spanish population data. *Forensic Sci Int* 1998; 98: 179–183.
43. Evett IW, Gill P, Lambert JA, Oldroyd, Fraizer R, Watson S, Panchal S, Connolly A, Kimpton C. Statistical analysis data for three British ethnic groups from a new STR multiplex. *Int J Legal Med* 1997; 110: 5.
44. Kupferschmid, T.D., Calicchio, T., and Budowle, B.: Maine Caucasian population DNA database using twelve short tandem repeat loci. *J. Forens. Sci.* 1999; 44: 392–395.
45. Drobnič K, Budowle B: The analysis of three short tandem repeat (STR) loci in the Slovene population by multiplex PCR. *J. Forens. Sci., v tisku – junij 2000.*
46. Weber, J. L. and May, P. E.: Abundant class of human polymorphisms which can be typed using polymerase chain reaction. *The American J of Human Genetics* 44:388; 1989.
47. Litt, M., and Luty, J. A.: A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44: 397; 1989.
48. Baechtel, S.: Basic principle of DNA typing. *FBI Academy Course, Quantico, 1997.*

16. Sullivan KM, Hopgood R., Gill P.: Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA. *Int J Leg Med* 105;83;1992.

17. Lutz S., Weisser HJ, Heizmann J., Pollak S.: mtDNA as a tool for identification of human remains – Identification using mtDNA. *Int J Leg Med* 109;205;1996.

18. Budowle, B., Adames, D. E., Comey, C. T., and Meril, C. R.: Mitochondrial DNA: A possible genetic material for forensic analysis. *DNA and Other Polymorphisms in Forensic Science. C. H. Lee and R. E. Gaensslen, Ed., Year Book Medical Publisher, Chicago, 76; 1990.*

19. Bogenhagen D, Clayton DA: The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and HeLa cells: quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem* 249;7991;1980.

20. Giles, R., Blanc, H., Cann, H. M. and Wallaces, D. C.: Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *PNAS USA* 77; 6715; 1980.

21. Jeffreys AJ, Allen MJ, Hagelberg E, Sonneberg A. Identification on the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. *For Sci Int* 56;65;1992.

22. Hagelberg, E., Gray, I. C., and Jeffreys, A. J.: Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 352: 427; 1991.

23. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, Watson, J. D.: Molecular biology of the cell. 3rd Ed., *Garland Publishing, New York, 1994.*

24. Vogel, F. and Motulsky, A. G.: Human genetics – problems and approaches. 3rd Ed. *Springer-Verlag, Berlin, 1997.*

25. Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M.: Recombinant DNA. 2nd Ed. *Scientific American Books, New York, 1992.*

26. Anderson S, Bankier A, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich D, Roe B, Sanger F, Schreier P, Smith A, Standen R, Young I: Sequence and organisation of human mitochondrial genome. *Nature* 290;457; 1981.

27. Brown MD, Wallace DC. Molecular basis of mitochondrial DNA disease. *J Bioenerg Biomembranes* 26;273;1994.

28. Parson W, Parson T, Scheithauer R, Holland M: Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial D-loop sequences: Application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. *Int J Leg Med* 111;124;1998.

29. Budowle B, Wilson M, Dizinno J, Stauffer C, Fasano M, Holland M, Monson K: Mitochondrial DNA regions HVI and HVII population data. *Forensic Sci Int*; 103: 23; 1999.

30. Robin ED, Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondrial per cell in mammalian cells. *J Cell Phys* 136: 507;1988.

31. Case, J. T. and Wallace, D. C.: Maternal inheritance of mitochondrial DNA polymorphisms in cultured human fibroblast. *Somatic Cell Genetics* 7: 103; 1981

32. Brown, W. M., Prager, E. M., Wang, A. and Wilson, A. C.: Mitochondrial sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J Mol Biol* 18: 225; 1982.

33. Cann, R. L., Stoneking, M., and Wilson, A. C.: Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325: 31; 1987.

34. Horai S, Hayasaka K: intraspecific nucleotide sequence difference in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 46;828; 1990.
35. Handt O, Meyer S, von Haessler A: Compilation of human mtDNA control region sequences. *Nuc Acids Res* 26; 126; 1998.
36. Parsons T, Muniec D, Sullivan K, Woodyatt N, Alliston-Greiner R, Wilson M, Berry D, Holland K, Weedn V, Gill P, Holland M: A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nature genetics* 15:363;1997
37. Piercy R, Sullivan KM, Benson N, Gill P: The application of mtDNA typing to the study of white Caucasian genetic identification. *Int J Leg Med* 106;85;1993.
38. Aquadro CF, Greenberg BD: Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequence from seven individuals. *Genetics* 103; 287;1983.
39. Hammond H, Jin L, Zhong Y, Caskey CT, Chakraborty R: Evaluation of 13 short repeat loci for use in personal identification applications. *Am J Hum Genet* 55;175;1994.
40. Santos S, Budowle B, Smerick JB, Keys KM, Moretti TR. Portuguese population data on the six short tandem repeat loci CSF1PO, TPOX, THO1, D3S1358, VWA and FGA. *Forensic Sci Int* 1996; 83: 229–235.
41. Garofano L, Pizzamiglio M, Vecchio C, Lago G, Floris T, D Errico G, Brembilla G, Romano A, Budowle B. Italian population data on thirteen short tandem repeat loci HUMTHO1, D21S11, D18S51, HUMVWAFA31, HUMFIB-RA, D8S1179, HUMTPOX, HUMCSF1PO, D16S539, D7S20, D13S317, D5S818, D3S1358. *Forensic Sci Int* 1998; 97: 53–60.
42. Entrala C, Lorente M, Lorente JA, Alvarey JC, Moretti T, Budowle B, Villanueva E. Fluorescent multiplex analysis of nine STR loci Spanish population data. *Forensic Sci Int* 1998; 98: 179–183.
43. Evett IW, Gill P, Lambert JA, Oldroyd, Fraizer R, Watson S, Panchal S, Connolly A, Kimpton C. Statistical analysis data for three British ethnic groups from a new STR multiplex. *Int J Legal Med* 1997; 110: 5.
44. Kupferschmid, T.D., Calicchio, T., and Budowle, B.: Maine Caucasian population DNA database using twelve short tandem repeat loci. *J. Forens. Sci.* 1999; 44: 392–395.
45. Drobnič K, Budowle B: The analysis of three short tandem repeat (STR) loci in the Slovene population by multiplex PCR. *J. Forens. Sci., v tisku – junij 2000.*
46. Weber, J. L. and May, P. E.: Abundant class of human polymorphisms which can be typed using polymerase chain reaction. *The American J of Human Genetics* 44:388; 1989.
47. Litt, M., and Luty, J. A.: A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44: 397; 1989.
48. Baechtel, S.: Basic principle of DNA typing. *FBI Academy Course, Quantico, 1997.*

49. Howell, N.: mtDNA recombination: What do in vitro data mean? *Am J Hum Genet* 61: 983; 1997
50. Holland MM, Parsons TJ: Mitochondrial DNA sequence analysis – validation and use for forensic casework. *Forensic Sci Rev* 11;21;1999.
51. Budowle, B., DiZinno, J. A. and Wilson, M.: Interpretation guidelines for mitochondrial DNA sequencing. *10th International Symposium on Human Identification, Promega, Florida, 1999.*
52. Bendall KE, Macaulay VA, Baker JR, Sykes BC. Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet* 59; 1276;1996.
53. Wilson MR, Polanskey D, Replogle J, DiZinno JA, Budowle B. A family exhibiting heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region reveals both somatic mosaicism and pronounced segregation of mitotypes. *Hum genet* 100; 167;1997.
54. Huhne J, Pfeiffer H, Brinkmann B. Heteroplasmic substitutions in mitochondrial DNA control region in mother and child samples. *Int J Leg Med* 112;31;1998.
55. Fisher D, Holland M, Mitchell L, Sledzik P, Wilcox A, Wadhams M, Weedn V: Extraction, evaluation and amplification of DNA from decalcified and un-decalcified United States Civil War bones. *J Forensic Sciences* 38:60;1993.
56. Hagelberg E, Quevado S, Turbon D, Clegg JB. DNA from ancient Easter islanders. *Nature* 369;25;1994.
57. Handt O, Richards M, Trommsdorff M, Kilger C, Simanainen J, Georgiev O, Bauer K, Stone A, Hedges R, Schaffner W, Utermann G, Sykes B, Paabo S. Molecular genetic analysis of the Tyrolean ice man. *Science* 264;1775;1994.
58. Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Paabo S. Neanderthal DNA sequences and origin of modern humans. *Cells* 90;19;1998.
59. Cattaneo C, Craig O, James N, Chir B, Sokol J: Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences. *J Forensic Sciences* 42:1126;1997.
60. Alford, R. L., Hammond, H. A., Coto, I., Caskey, C. T.: Rapid and efficient resolution of parentage by amplification of short tandem repeats. *Am J Hum Genet* 55: 190; 1994.
61. Fregeau CJ, Fournery RM: DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: a sensitive and accurate approach to human identification. *Bio-techniques* 15;100;1993.
62. Kimpton CP, Gill P, Walton A, Urquhart A, Millican ES, Adams M. Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Applic* 1993; 3: 13–22.
63. Kimpton CP, Fisher D, Watson S, Adams M, Urquhart A, Lygo J, Gill P. Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci. *Int J Leg Med* 1994; 106: 302–311.
64. National Research Council. The evaluation of forensic DNA evidence. *National Academy Press. Washington DC; 1996.*
65. Technical Working Group on DNA Analysis Methods. Guidelines for a quality assurance program for DNA analysis. *Crime Lab Digest* 22;21;1995.

66. Jeffreys, A.J., Brookfield, J. F. Y., Semeonoff, R.: Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 317: 818; 1985.
67. Gill, P, Werrett, D. J: Exclusion of a man charged with murder by DNA fingerprinting. *Forensic Science Inter* 35: 145; 1987.
68. Jeffreys, A. J and Pena, S. D. J.: Brief introduction to human DNA fingerprinting. *DNA Fingerprinting*, Birkhauser Verlag, Basel, 1993.
69. Chakraborty, R. and Stivers, D. N.: Paternity exclusion by DNA markers: effects of paternal mutations. *J of Forensic Sciences* 41: 671; 1996.
70. Weber, J. L. Wong, C.: Mutation of human short tandem repeats. *Hum Molecular Genet* 8: 1123;1993.
71. Nei M, Rozchoudhury AK. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 1974; 78: 583–590.
72. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 1978; 89: 583–590.
73. Chakraborty R, Smouse PE, Neel JV. Population amalgamation and genetic variation observation on artificially agglomerated tribal population of central and south America. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 709–725.
74. Guo SW. and Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; 48: 371–372.
75. Karlin S, Cameron EC, Williams PT. Sibling and parent-offspring correlation estimation with variable family size. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 1981; 78: 2664–2668.
76. Fisher R. Standar calculation for evaluating a blood group system. *Heredity* 1951; 5: 95–102
77. Weir BS. Multiple tests. In *Genetic data analysis*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts 1990.
78. Evett, I.A. and Weir, B.S.: Interpreting DNA evidence. Statistical genetics for forensic scientists. *Sinauer Associates, Sunderland, Inc. Massachusetts*, 1998.
79. Weir, B. S.: Genetic data analysis II. *Sinauer Associates, Inc., Massachusetts*, 1996.
80. Sullivan KM, Hopgood R, Lang B, Gill P: Automated amplification and sequencing of human mitochondrial DNA. *Electrophoresis* 12;17;1991.
81. Carracedo A, Aloja ED, DupuyB, Jangblad A, Karjalainen M, Lambert C, Parson W. Pfeiffer H, Pfitzinger H, Sabatier M, Syndercombe D, Vide C. Reproducibility of mtDNA analysis between laboratories: a report of European DNA profiling group (EDNAP). *For Sci Int* 97;165;1998.
82. Howell N, Halvorosn S, McCullough DA, Bindoff LA, Turnbull DM. Mitochondrial gene segregation in mammals: Is the bottleneck always narrow? *Hum Genet* 90;117;1992.
83. Marchington DR, Hartshorne GM, Barlow D, Poulton J. Homopolymeric tract heteroplasmy in mtDNA from tissue and single oocytes: support for a genetic bottleneck. *Am J Hum Genet* 60;408; 1997.

49. Howell, N.: mtDNA recombination: What do in vitro data mean? *Am J Hum Genet* 61: 983; 1997
50. Holland MM, Parsons TJ: Mitochondrial DNA sequence analysis – validation and use for forensic casework. *Forensic Sci Rev* 11;21;1999.
51. Budowle, B., DiZinno, J. A. and Wilson, M.: Interpretation guidelines for mitochondrial DNA sequencing. *10th International Symposium on Human Identification, Promega, Florida, 1999.*
52. Bendall KE, Macaulay VA, Baker JR, Sykes BC. Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet* 59; 1276;1996.
53. Wilson MR, Polanskey D, Replogle J, DiZinno JA, Budowle B. A family exhibiting heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region reveals both somatic mosaicism and pronounced segregation of mitotypes. *Hum genet* 100; 167;1997.
54. Huhne J, Pfeiffer H, Brinkmann B. Heteroplasmic substitutions in mitochondrial DNA control region in mother and child samples. *Int J Leg Med* 112;31;1998.
55. Fisher D, Holland M, Mitchell L, Sledzik P, Wilcox A, Wadhams M, Weedn V: Extraction, evaluation and amplification of DNA from decalcified and un-decalcified United States Civil War bones. *J Forensic Sciences* 38:60;1993.
56. Hagelberg E, Quevado S, Turbon D, Clegg JB. DNA from ancient Easter islanders. *Nature* 369;25;1994.
57. Handt O, Richards M, Trommsdorff M, Kilger C, Simanainen J, Georgiev O, Bauer K, Stone A, Hedges R, Schaffner W, Utermann G, Sykes B, Paabo S. Molecular genetic analysis of the Tyrolean ice man. *Science* 264;1775;1994.
58. Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Paabo S. Neanderthal DNA sequences and origin of modern humans. *Cells* 90;19;1998.
59. Cattaneo C, Craig O, James N, Chir B, Sokol J: Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences. *J Forensic Sciences* 42:1126;1997.
60. Alford, R. L., Hammond, H. A., Coto, I., Caskey, C. T.: Rapid and efficient resolution of parentage by amplification of short tandem repeats. *Am J Hum Genet* 55: 190; 1994.
61. Fregeau CJ, Fournery RM: DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: a sensitive and accurate approach to human identification. *Bio-techniques* 15;100;1993.
62. Kimpton CP, Gill P, Walton A, Urquhart A, Millican ES, Adams M. Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Applic* 1993; 3: 13–22.
63. Kimpton CP, Fisher D, Watson S, Adams M, Urquhart A, Lygo J, Gill P. Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci. *Int J Leg Med* 1994; 106: 302–311.
64. National Research Council. The evaluation of forensic DNA evidence. *National Academy Press. Washington DC; 1996.*
65. Technical Working Group on DNA Analysis Methods. Guidelines for a quality assurance program for DNA analysis. *Crime Lab Digest* 22;21;1995.

66. Jeffreys, A.J., Brookfield, J. F. Y., Semeonoff, R.: Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 317: 818; 1985.
67. Gill, P, Werrett, D. J: Exclusion of a man charged with murder by DNA fingerprinting. *Forensic Science Inter* 35: 145; 1987.
68. Jeffreys, A. J and Pena, S. D. J.: Brief introduction to human DNA fingerprinting. *DNA Fingerprinting*, Birkhauser Verlag, Basel, 1993.
69. Chakraborty, R. and Stivers, D. N.: Paternity exclusion by DNA markers: effects of paternal mutations. *J of Forensic Sciences* 41: 671; 1996.
70. Weber, J. L. Wong, C.: Mutation of human short tandem repeats. *Hum Molecular Genet* 8: 1123;1993.
71. Nei M, Rozchoudhury AK. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 1974; 78: 583–590.
72. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 1978; 89: 583–590.
73. Chakraborty R, Smouse PE, Neel JV. Population amalgamation and genetic variation observation on artificially agglomerated tribal population of central and south America. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 709–725.
74. Guo SW. and Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; 48: 371–372.
75. Karlin S, Cameron EC, Williams PT. Sibling and parent-offspring correlation estimation with variable family size. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 1981; 78: 2664–2668.
76. Fisher R. Standar calculation for evaluating a blood group system. *Heredity* 1951; 5: 95–102
77. Weir BS. Multiple tests. In *Genetic data analysis*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts 1990.
78. Evett, I.A. and Weir, B.S.: Interpreting DNA evidence. Statistical genetics for forensic scientists. *Sinauer Associates, Sunderland, Inc. Massachusetts*, 1998.
79. Weir, B. S.: Genetic data analysis II. *Sinauer Associates, Inc., Massachusetts*, 1996.
80. Sullivan KM, Hopgood R, Lang B, Gill P: Automated amplification and sequencing of human mitochondrial DNA. *Electrophoresis* 12;17;1991.
81. Carracedo A, Aloja ED, DupuyB, Jangblad A, Karjalainen M, Lambert C, Parson W. Pfeiffer H, Pfitzinger H, Sabatier M, Syndercombe D, Vide C. Reproducibility of mtDNA analysis between laboratories: a report of European DNA profiling group (EDNAP). *For Sci Int* 97;165;1998.
82. Howell N, Halvorosn S, McCullough DA, Bindoff LA, Turnbull DM. Mitochondrial gene segregation in mammals: Is the bottleneck always narrow? *Hum Genet* 90;117;1992.
83. Marchington DR, Hartshorne GM, Barlow D, Poulton J. Homopolymeric tract heteroplasmy in mtDNA from tissue and single oocytes: support for a genetic bottleneck. *Am J Hum Genet* 60;408; 1997.