

Primjena forenzične DNA analize: interdisciplinarna perspektiva

Petar Projić¹, Gordan Lauc^{1,2}, Dragan Primorac^{1,3,4,5,6}

DNA analiza danas nedvojbeno ima nezamjenjivu ulogu u sveukupnim forenzičnim znanostima. Otkriće i primjena molekularnih STR biljega značajno je unaprijedila forenzičnu DNA analizu. Najbolje ispitivani i najčešće uključivani u analize individualne i populacijske raznolikosti su tetranukleotidni STR biljezi.

Uporaba SNP molekularnih biljega jedan je od novijih pristupa u populacijsko-genetičkim studijama, medicinskoj dijagnostici i testiranju identiteta. Najveći dio SNP-ova sastavni je dio nekodirajućeg dijela genoma, pa se smatra da su selektivno neutralni. Ipak, postoji određeni broj SNP-ova smještenih u kodirajućoj regiji genoma (cSNP) i oni mogu utjecati na razvoj različitih multifaktorskih bolesti. Za razliku od autosomnih biljega koji variraju kroz generacije, Y-vezani i mitohondrijski biljezi prolaze kroz generacijske barijere neizmijenjeni (u odsutnosti mutacija), zbog čega se često primjenjuju u populacijskoj, humanoj i forenzičnoj genetici za praćenje roditeljskih linija. Kromosom Y ima važnu ulogu u slučajevima silovanja te kod utvrđivanja migracije pojedinih naroda. Razvojem molekularnih metoda proteklih godina uloga DNA analize u animalnoj i biljnoj forenzici postala je vrlo značajna. Broj sudskih predmeta u kojima su kao dokazi primjenjivani tragovi životinjskog i biljnog podrijetla značajno je porastao. DNA tehnologija također ima vrlo važnu ulogu u identifikaciji mikroorganizama koje je moguće upotrijebiti radi bioterorističkog napada. Primjena utvrđivanja identiteta analizom DNA posebno je važna kod otkrivanja žrtava trgovine ljudima, žrtava seksualnog i radnog iskorištavanja te suzbijanja nezakonitih useljavanja i nezakonitih posvojenja. Najnoviji trend u području forenzične genetike je DNA fenotipizacija. Primjenom SNP biljega u procesu genotipizacije pokušavaju se predvidjeti pojedine fenotipske karakteristike, poput boje kože, očiju, kose i sl., radi utvrđivanja identiteta posmrtnih ostataka ili individualizacije osobe koja je ostavila biološki trag.

Ključne riječi: biometrička identifikacija; biološki markeri; forenzična medicina; bioterorizam; emigracija i imigracija

UVOD

DNA analiza danas nedvojbeno ima nezamjenjivu ulogu u sveukupnim forenzičnim znanostima. Ova metoda je doživjela znanstvenu promociju prije 20 godina u radovima engleskog genetičara *Aleca Jeffreysa*. On je opisao postojanje DNA sljedova (sekvenci) jasno lociranih u humanom genomu, koji se uzastopno ponavljaju određeni broj puta. Potvrdio je da broj tih ponavljajućih jedinica može individualno varirati u promatranom populacijskom uzorku. Usavršavanjem metoda ispitivanja dužinskih varijacija ovih ponavljajućih DNA sljedova, Jeffreys je omogućio pokretanje masovnog provođenja humanog DNA testiranja, što je dovelo do razvoja nove znanstvene discipline koja se naziva forenzična genetika. Forenzična genetika proučava primjenu genetičkih spoznaja u sudskim procesima, a zasniva se na

kompleksnoj interakciji velikog broja znanstvenih područja kao što su biologija, biotehnologija, genetika (posebno populacijska i molekularna), biokemija, matematika, biostatistika, medicina, tehnologija, pravo i etika (1). U posljednjih dvadesetak godina širom svijeta su baš DNA analizom rasvijetljeni brojni sudsko-medicinski slučajevi (2, 3). Nekoliko

¹ DNA Laboratorij, Genos, Zagreb

² Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

³ Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

⁴ Medicinski fakultet, Sveučilište u Osijeku

⁵ Eberly College of Science, Penn State University, University Park, PA, USA

⁶ University of New Haven, New Haven, CT, USA

Adresa za dopisivanje:

Petar Projić, prof. biol. i kem., DNA Laboratorij, Genos, Zagreb, Hondlova 2/11, 10 000 Zagreb

Primljeno/Received: 4. 11. 2013., Prihvaćeno/Accepted: 22. 11. 2013

je glavnih područja primjene analize DNA u sudskoj medicini: istraživanje kriminalnih radnji, utvrđivanje identiteta osoba i dokazivanje očinstva. Prema nekim spoznajama samo u Sjedinjenim Američkim Državama godišnje se realizira više od stotinu tisuća DNA analiza radi različitih vještačenja. Kroz "DNA Innocence Project", pokrenut u Sjedinjenim Američkim Državama radi oslobađanja pogriješno optuženih osoba, zahvaljujući prvenstveno analizi DNA u proteklih dvadeset godina oslobođeno je gotovo 300 osoba, od kojih su neke bile osuđene na smrtnu kaznu.

Ova metoda je odigrala izuzetno bitnu ulogu i na našim prostorima kroz projekte identifikacije žrtava rata u Hrvatskoj i okolnim zemljama zahvaćenim ratom (4, 5, 6, 7).

GENETIČKI BILJEZI U PROCESU IDENTIFIKACIJE I INDIVIDUALIZACIJE

DNA analiza u forenzičnoj genetici temelji se na spoznaji da je samo 0,5 % DNA različito kod svake osobe. Taj mali dio DNA sadrži veliki broj polimorfizama, odnosno razlika u genetičkim informacijama između pojedinaca. Polimorfizam se definira kao varijacija, promjena ili mutacija DNA slijeda na određenoj, specifičnoj lokaciji. Stoga možemo s gotovo potpunom sigurnošću tvrditi da sve osobe, osim jednojajčanih blizanaca, imaju jedinstvenu genetičku građu. Baš se na toj činjenici temelje analize različitih bioloških tragova koje se provode u procesima utvrđivanja identiteta, očinstva, srodstva i sl. Većina gena nije tolerantna prema mutacijama. Geni koji toleriraju mutacije imaju više od jednog oblika, odnosno imaju svoje alele. Lokusi koji sadržavaju alele što se pojavljuju s relativno visokom učestalošću nazivaju se polimorfni lokusi. Genetička varijabilnost kod krvnih skupina, serumskih proteina i transplantacijskih antigena na razini proteina odraz je polimorfizma, odnosno varijabilnost na razini DNA.

Do revolucionarnog otkrića strukture ljudskog genoma 2001. godine došle su dvije odvojene skupine istraživača: međunarodni konzorcij za sekvenciranje humanog genoma pod vodstvom Erica Landera i Celera Genomics pod vodstvom Craiga Ventera (8, 9). Cilj obiju skupina bio je utvrditi potpuni slijed svih nukleotida ljudskog genoma koji sadrži oko 3×10^9 parova baza. Uslijedilo je veliko iznenađenje kad se otkrilo da ljudski genom ima svega 20 000 do 30 000, a ne kako se ranije predviđalo 100 000 gena. Zbog alternativnog prekrivanja (prema engl. *alternative splicing*) izvjesno je da pojedinačni geni daju više od jedne glasničke RNA (mRNA), što prema nekim predviđanjima rezultira činjenicom da taj relativno mali broj gena kodira više od 100 000 proteina. Znanstvenike je posebno iznenadila činjenica da tek nešto više od 1% ukupne DNA sadrži sljedove koji kodiraju proteine.

Razvoj metoda molekularne biologije tijekom proteklih dvaju desetljeća omogućio je uvođenje metoda koje mogu nedvojbeno utvrditi identitet i rodbinske odnose među jedinkama na temelju analize njihove DNA. Sve se ove analize u suvremenoj, primijenjenoj znanosti zasnivaju prvenstveno na analizi i primjeni genetičkih biljega. Genetički marker zapravo opisuje dio DNA čiji su svojstva i pozicija (lokus) jasno definirani i na osnovi kojih se međusobno razlikuju živi sustavi (10). Na osnovi dužine ponavljajućeg slijeda dijele se na minisatelite (10 – 100 bp) i mikrosatelite (2 – 10 bp).

Promjenjivi broj ponavljajućeg niza (prema engl. *Variable Number Tandem Repeats* - VNTR) biljezi su tipični minisatelitni biljezi koji su upotrebljavani u ranim forenzično-genetičkim analizama. Većina ovih polimorfničkih biljega smještena je u nekodirajućem dijelu DNA (introni), pa samim tim nisu pod utjecajem prirodne selekcije, što ih čini izvrsnim biljezima za genetičku identifikaciju bioloških sustava. Karakterizira ih relativno velika stopa mutacija (11) koje uzrokuju promjene u broju ponavljajućih sljedova unutar promatranog biljega, a broj različitih alelnih inačica na njima može biti veći i od 100. Osnovni nedostaci u primjeni ovih biljega bili su: kompleksnost i dugotrajnost procesa analize, što je značajno ograničavalo broj uzoraka koji se može procesuirati u određenom trenutku, potrebna relativno velika količina DNA koja nije degradirana, uporaba radioaktivnih materijala te visoka cijena analize. Tehnika koja se primjenjivala u detekciji VNTR biljega bila je analiza polimorfizma duljine slijeda restrikcijskih odsječaka (prema engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP).

Otkriće mikrosatelita, odnosno kratkih uzastopnih ponavljajućih sljedova (prema engl. *Short Tandem Repeats* - STR) te utvrđivanje njihovih osnovnih značajki, dovelo je do njihovog jasnog definiranja kao molekularnih polimorfizama koji se danas široko primjenjuju u forenzičnoj genetici (12). Najbolje ispitivani i najčešće uključivani u analize individualne i populacijske raznolikosti su tetranukleotidni STR lokusi, odnosno lokusi u čijim se ponavljajućim sljedovima nalaze četiri baze. Radi brže i jednostavnije analize različitih tragova osmišljen je model tzv. multipleks STR sustava. Na takav način danas je moguće istodobno umnožavanje i analiza više od 10 STR biljega metodom polimeraza lančanom reakcijom (prema engl. *Polymerase Chain Reaction* – PCR). Postoji vrlo veliki broj setova reagensa, odnosno multiplex STR sustava koji se trenutno primjenjuju u analizama DNA radi utvrđivanja identiteta, očinstva, srodstva, kao i u forenzičnim DNA analizama.

Usporedno s uvođenjem, razvojem i primjenom STR lokusa za rutinske analize u forenzičnoj DNA analizi bioloških tragova, javila se potreba za standardizacijom ovih analiza, a to je podrazumijevalo uspješnu međusobnu razmjenu podata-

ka. Osnovni preduvjet za to bila je primjena istih genetičkih biljega. Prvu službenu DNA bazu podataka zasnovanu na uporabi 13 STR lokusa, razvio je FBI (prema engl. *Federal Bureau of Investigation*) sredinom 90-tih godina prošlog stoljeća (13). Ova baza podataka nazvana je CODIS (prema engl. *Combined DNA Indexing System*). Nacionalnim DNA indeksnim sustavom (prema engl. *National DNA Index System* – NDIS), programom na nacionalnoj razini, upravlja FBI na tajnoj lokaciji. U svom prvobitnom izdanju CODIS se sastojao od dva dijela: indeksa osuđenih prijestupnika i forenzičnog indeksa. Prvi indeks sadržavao je profile osoba osuđenih za neki zločin, a forenzični indeks profile dobivene iz bioloških tragova nađenih na mjestu događaja. CODIS je kroz godine dodao i neke nove indekse: indeks uhićenih osoba, indeks nestalih ili neidentificiranih osoba i referentni indeks nestalih osoba. Tijekom 2011. i 2012. godine najavila se potreba i mogućnost proširenja postojećeg CODIS seta lokusa. INTERPOL je svoju DNA bazu podataka uspostavio 2002. godine. Da bi se DNA profil inkorporirao u INTERPOL bazu podataka mora biti analiziran na najmanje 6 od ponuđenih 12 osnovnih i 16 dodatnih STR lokusa.

Jedan od najnovijih pristupa koji ubrzano pronalazi svoju primjenu u forenzičnoj DNA analizi je uporaba polimorfizama jednog nukleotida (prema engl. *Single Nucleotide Polymorphism* – SNP) molekularnih biljega. To su najučestaliji oblici DNA polimorfizama koji se javljaju unutar humanog genoma. U posljednjih nekoliko godina, posebno s otkrićem mogućnosti primjene novih tehnika, doživjeli su potpunu afirmaciju ne samo u populacijsko-genetičkim studijama, već i u medicinskoj dijagnostici i testiranju identiteta. Ovaj polimorfizam se zasniva na zamjeni samo jedne baze u standardnom redoslijedu promatranog slijeda. Najveći broj polimorfizama u humanom genomu odnosi se na SNP genetičke markere (14). SNP-ovi nastaju insercijom, delecijom ili kao posljedica točkastih mutacija kad je u procesu promjene u pitanju samo jedan nukleotid. Iako su manje polimorfni u odnosu na danas široko primjenjivane STR markere, njihovo pojavljivanje na gotovo svakih 1000 bp čini ih izuzetno informativnim. Najveći dio SNP-ova je sastavni dio nekodirajućeg dijela genoma, pa se smatra da su selektivno neutralni. Ipak, postoji određeni broj SNP-ova prisutnih u kodirajućoj regiji genoma (cSNP) i oni mogu utjecati na razvoj različitih multifaktorskih bolesti. Procjenjuje se da se broj cSNP-ova kreće između 10 000 i 50 000. Polimorfizmi detektirani na ovim genetičkim biljezima mogu dovesti do promjene u redoslijedu aminokiselina u proteinskom produktu (15, 16, 17, 18).

U posljednjih nekoliko godina zabilježeno je značajno povećanje populacijskih podataka vezanih za SNP markere locirane na nerekombinirajućem dijelu kromosoma Y. U vrlo kratkom razdoblju uočeno je više od 200 SNP-ova i malih

insercijskih delecijских (*indel*) pozicija koje karakterizira niska stopa paralelnih mutacija, što ih čini izuzetno pogodnim za identifikaciju i praćenje roditeljske linije tisućama godina unatrag. Ipak, jedan od primarnih smjerova razvoja u testiranju ovih biljega upravljen je prema dodatnoj analizi mitohondrijske DNA (19).

ANALIZA SPOLNIH KROMOSOMA I MITOHONDRIJSKE DNA (mt DNA)

Za razliku od autosomnih biljega koji zbog nasljeđivanja alelnih inačica od majke i od oca jasno variraju kroz generacije, Y-vezani i mitohondrijski biljezi prolaze kroz generacijske barijere neizmijenjeni (u odsutnosti mutacija). Baš iz tih razloga ovi se biljezi često primjenjuju u populacijskoj, humanoj i forenzičnoj genetici za praćenje roditeljskih linija; mitohondrijska DNA za ispitivanje majčinske, a kromosom Y za ispitivanje očeve linije. Stoga se ovi biljezi označavaju, u slobodnom prijevodu, kao obiteljski (engl. *lineage*).

Svi muški srodnici po očevoj liniji imaju identičan Y haplotip, dok svi srodnici po ženskoj liniji imaju identičan mtDNA haplotip. Uporaba ovih biljega u forenzičnoj genetici ima i određene limite. Nisu informativni poput autosomnih STR lokusa i zahtijevaju poseban model statističke analize.

Ipak, zbog svojih genetičkih posebnosti ovi biljezi mogu poslužiti kao izuzetno jako i učinkovito oruđe, posebno kao potpora rezultata dobivenih analizom autosomnih biljega u procesima forenzične DNA analize.

Analiza spolnih kromosoma važna je u slučaju potrebe određivanja spola i već u startu isključuje 50% populacije. Marker koji se najčešće analizira prilikom utvrđivanja spola nalazi se u intronu 1 gena amelogenina koji je lociran na spolnim kromosomima. Inačica gena na kromosomu X je kraća za 6 bp u odnosu na inačicu na kromosomu Y (muški spol).

KROMOSOM Y

U usporedbi s drugim humanim kromosomima kromosom Y ima deficitarni broj gena, a približno 50% njegovog slijeda se sastoji od ponavljajućih elemenata. Može pružiti važne informacije kod određivanja nasljednih linija za mušku osobu, jer sadrži visokopolimorfne regije. Humani kromosom Y je prisutan kod normalnih muškaraca u jednoj kopiji, nasljeđuje se po ocu, a 95% njegovog kompleksa ne podliježe rekombinaciji, odnosno čini tzv. "nerekombinantni Y" (NRY). U forenzičnim analizama kromosom Y ima važnu ulogu u slučajevima silovanja, a posebno u onima koja uključuju više od jednog muškarca (20). Y-STR biljezi također mogu biti korisni u slučajevima dokazivanja očinstva ili daljeg srodstva po muškoj liniji, kad su djeca muškog spola te u procesu identifikacije kad su prisutni srodnici samo s očeve

strane. Kromosom Y se sve više primjenjuje i kod utvrđivanja migracije pojedinih naroda tijekom prošlosti, jer ne podliježe rekombinaciji tijekom generacijskog prenošenja genetičkog materijala (21). Neka istraživanja su ponudila izuzetno zanimljive modele i scenarije ljudske povijesti i na našim prostorima (22, 23, 24), te su promovirala i uporabnu vrijednost SNP biljega. Analiza Y-STR biljega ima također važnu ulogu u rijetkim, ali važnim slučajevima kad postoji nedostatak amelogena gena u muškarca (25, 26). Jedan od pokazatelja koliko je ozbiljno i bitno analiziranje kromosoma Y u forenzičnoj DNA analizi je i relativno veliki broj komercijalnih multipleksnih sustava koji je dosad dizajniran.

KROMOSOM X

U posljednje vrijeme u fokusu zanimanja znanstvenika iz područja forenzične genetike našli su se gonosomni polimorfizmi, a među njima osobito STR biljezi pozicionirani na kromosomu X (27). X-vezani STR biljezi danas se razvijaju u vrlo upotrebljivo dodatno oruđe, koje u zajedničkoj primjeni s autosomnim i Y-vezanim STR biljezima može pružiti nužne informacije, osobito u slučajevima kad je riječ o ženskom potomstvu, a potencijalni biološki otac iz određenog razloga nije dostupan, te radi testiranja očinstva nad ženskom djecom u odsutnosti oca i to po načelu procesiranja bioloških uzoraka očevih bližih srodnika (28). Nasljeđivanje gena smještenih na kromosomu X podliježe specifičnim pravilima koja proizlaze iz sljedećih činjenica: muškarci imaju samo jedan kromosom X, gotovo svi geni na kromosomu X nemaju svoj alelni "duplikat" na kromosomu Y i bilo koji gen smješten na kromosomu X, ako je i recesivan kod žena, kod muškaraca je funkcionalno aktivan, što znači da dolazi do njegove ekspresije. Geni koji se nasljeđuju po ovakvom načelu nasljeđivanja definirani su kao spolno vezani, odnosno X-vezani geni, kad je riječ o kromosomu X. Jedan od primjera ovakvog modela (X-vezanoga) nasljeđivanja je hemofilija A, koja se najčešće nasljeđuje recesivno. Uz hemofiliju dosad je dijagnosticirano mnogo poznatih bolesti koje se nasljeđuju s kromosoma X poput: Duchenneove mišićne distrofije, Lesch – Nyhanovog sindroma, G6PD deficijencije, neraspoznavanja boja te niza drugih. Ako aficirani muškarac ima žensko potomstvo, sve njegove kćeri nasljeđuju očev defektni kromosom X i prenose ga na polovicu sljedeće generacije. Shodno tome, polovica ženskog potomstva nositeljice su defektnog gena, a polovica muškog potomstva eksprimira defektni gen, jer su hemizigoti za gene smještene na kromosomu X (29). Poput autosomnih i Y-vezanih STR biljega, X-vezani STR biljezi su visokoinformativni DNA markeri. Analiziraju se primarno PCR metodom. Genomska baza podataka (prema engl. *Genom Database*) dosad posjeduje više od stotinu sekvenciranih STR polimorfizama

smještenih na kromosomu X, a sustavno se radi na istraživanju i razvoju novih X-STR biljega, koji bi također bili pogodni za primjenu za forenzične DNA analize. Provedeno je nekoliko studija u regiji, na 8 X-vezanih STR biljega (30) te na 14 X-vezanih STR biljega koji su u sastavu dvaju analiziranih mini-X-pleksa: mini X1 i mini X2 (31).

mtDNA

Analiza mtDNA uvedena je kao dodatna metoda u sudsko-medicinsku praksu. Njena osnovna primjena je također identifikacija osoba, bilo da su one žrtve nesreća ili prirodnih katastrofa, odnosno žrtve zločina ili ratnih djelovanja. Postoje određene prednosti zbog kojih je analiza mtDNA uvedena kao metoda u praksu, a jedna od njih je velik broj istovjetnih kopija mtDNA koje se nalaze u različitom broju mitohondrija unutar svake somatske stanice. Baš ta brojnost molekula mtDNA u pojedinoj eukariotskoj stanici povećava vjerojatnost njenog uspješnog izdvajanja i iz uzoraka u kojima se DNA zbog vanjskih uvjeta s vremenom ubrzano raspada. Procjenjuje se da normalna oocita sadrži oko 100 000 kopija mtDNA (32, 33). Funkcija, mutacije, populacijska varijabilnost i nasljedni poremećaji mitohondrijskog genoma detaljno su istraženi i poznate su specifične delecije, udvostručenja i brojne točkaste mutacije koje dovode do različitih specifičnih patofizioloških sindroma. Točkaste mutacije uzrokuju: mitohondrijsku miopatiju, encefalomiopatiju, laktat acidozu, stroke-CVI (MELAS), mioklonu epilepsiju s pokidanim mišićnim vlaknima (prema engl. *ragged red fibers*) (MERRF), Leberovu nasljednu optičku neuropatiju, Leighov sindrom (subakutna nekrotizirajuća encefalomijelopatija). Velika preslagivanja mitohondrijske DNA povezana su s nastankom: Kearns – Sayrovog sindroma, progresivne oftalmoplegije, Pearsonova sindroma i dr. Nakupljanje somatskih mutacija (stečenih za vrijeme života) smatra se jednim od uzroka degenerativnih promjena stanica, tkiva i organa starenjem (34).

MtDNA ima vrlo visoku stopu mutacija, a osobito njena nekodirajuća regija. Dio mitohondrijskog genoma koji najbrže evoluirao je nekodirajuća kontrolna regija koja se još naziva i D-petlja (prema engl. *D-loop*). Postoje dvije hipervarijabilne regije unutar one kontrolne u kojima je frekvencija mutacija razmjerno velika: hipervarijabilna regija 1 (HV1) i hipervarijabilna regija 2 (HV2). Sekvenciranje tih dvaju segmenata zbog visoke varijabilnosti najviše se primjenjuje u sudskoj medicini i kriminalistici.

Osnovna značajka nasljeđivanja mtDNA je da ta se nasljeđuje po majčinoj liniji, što znači da braća i sestre imaju isti slijed nukleotida mtDNA koji je istovjetan onom njihovih majki (spajanjem citoplazmi spermija i jajne stanice u zigoti očito dolazi do dominacije mitohondrijskih DNA mo-

lekula majčina podrijetla). Osim toga, izvjesno je da postoje neki specifični mehanizmi koji prepoznaju i uklanjaju tih nekoliko kopija očinske mtDNA ako dospiju u citoplazmu zigote (35, 36). Osnovni nedostatak ove metode kod identifikacija je ograničena mogućnost pozitivne identifikacije. Novija mogućnost povećavanja diskriminativnosti i vjerojatnosti pozitivnog nalaza je analiza većeg broja SNP biljega (37, 38). Pojava mikročipova za analizu SNP biljega dodatno pojednostavljuje postupak i povećava kvalitetu i pouzdanost analize (39).

PRIMJENA DNA ANALIZE U GENETIČKOJ KARAKTERIZACIJI ŽIVOTINJA

Analogno metodama za analizu humane DNA razvijene su i metode za analizu DNA različitih životinjskih vrsta. Danas je moguće s vrlo visokim stupnjem vjerojatnosti dokazati potječu li dva biološka uzorka (krv, meso, kost, dlaka, slina...) od iste životinje, od njezinih roditelja ili djece, ili od nesrodnih jedinki. Broj sudskih predmeta u kojima su kao dokazi upotrijebljeni tragovi životinjskog podrijetla značajno je porastao posljednjih godina. Jedna od mogućih podjela pri analizi DNA životinjskih uzoraka je podjela prema vrsti životinje od koje potječe biološki uzorak. Razlikujemo forenzičnu entomologiju i animalnu forenziku kralježnjaka (potkoljeno vertebrata).

Forenzična entomologija se bavi proučavanjem kukaca i ostalih člankonožaca u svjetlu pravnih i kriminalističkih istraga. Najčešća primjena forenzične entomologije je u sudsko-medicinskim slučajevima kod ubojstava, samoubojstava, silovanja, fizičkog zlostavljanja i krijumčarenja. DNA analizom kukaca može se povezati osumnjičenog s mjestom zločina ili sa žrtvom, dokazati da je tijelo žrtve bilo pomicano i utvrditi vrijeme smrti žrtve (40, 41). Analiza humane DNA izdvojene iz kukaca još je jedna bitna primjena molekularnih metoda u rasvjetljavanju zločina. Ova metoda može biti korisna u slučajevima kad je truplo dislocirano, te su pronađene samo ličinke na mjestu mogućeg ubojstva, na mjestu zločina postoji alternativni izvor hrane koji je mogao rezultirati pojavom ličinki nekrofagnih kukaca, te kad je pouzdanost prikupljenih dokaza sporna (42, 43).

Kad govorimo o animalnoj forenzici kralježnjaka (potkoljeno vertebrata), primjena analize STR biljega u životinjskim uzorcima može se načelno usmjeriti u dva osnovna pravca: standardna forenzična primjena utvrđivanja podrijetla pronađenog biološkog traga (44, 45) i analiza životinjskog DNA pri kontroli podrijetla prehrambenih proizvoda (46). Tri su glavne skupine forenzičnih slučajeva kad je životinjski DNA dokaz: životinja kao svjedok (povezivanje osumnjičenog i žrtve ili povezivanje osumnjičenog s mjestom zločina); životinja kao žrtva i životinja kao počinitelj - pri napadu na

čovjeka. Jedan od prvih opisanih slučajeva u kojem je biološki uzorak životinjskog podrijetla (mačja dlaka) povezo osumnjičenog i mjesto zločina, bio je slučaj „Snowball” (47). Otad su tragovi životinjskog podrijetla upotrebljavani kao dokazi u velikom broju sudskih predmeta, uključujući one koji se odnose na prometne nesreće, ubojstva, pljačke banaka, napade psa kad je žrtva čovjek te pseće napade kad je žrtva pas ili druga životinja. Pri forenzičnoj analizi jezgrine (nuklearne) DNA u životinja gotovo isključivo je riječ o analizi mikrosatelitnih ponavljanja. Utvrđeno je da STR lokusi koji se primjenjuju u postupcima utvrđivanja identiteta za pse (48, 49), imaju gotovo podjednaku snagu diskriminacije kao i humani STR lokusi. Osim za pse, multipleksni STR sustavi za identifikaciju vrste/jedinke primjenjuju se za goveda i druge domaće životinje, mačke, ptice, ribe i sl. U najvećem broju slučajeva ovi STR sustavi nisu tako optimizirani kao oni koji se primjenjuju za analizu ljudskih tragova.

Posljednjih godina je snažno podignuto stanje svijesti javnosti o sastavu prehrambenih proizvoda, prvenstveno zbog pojave različitih čimbenika poput genetički modificiranih organizama (GMO), alergija na hranu, nesavjesnosti nekih proizvođača hrane, strahova u vezi s hranom („kralje ludilo”, ptičja gripa, slinavka, šap...), religijskih razloga itd. Kontrola podrijetla prehrambenih proizvoda izuzetno je bitna s više stajališta, a jedan od značajnijih primjera je kod identifikacije goveda koja su zanimljiva zbog velikog značenja i zastupljenosti u ljudskoj prehrani. Molekularna biologija omogućuje praćenje „putova” životinja koje ulaze u ljudsku prehranu (engl. *from stable to table*), te time i pomoć u suzbijanju „crnog tržišta” stoke, a posebno goveda (50). Danas postoji nekoliko komercijalnih setova reagensa koji se rutinski primjenjuju u procesima identifikacije i ispitivanja podrijetla goveda. Mikrosateliti uključeni u postojeće komercijalne setove su dinukleotidi, odnosno kratka ponavljanja koja se sastoje od samo dvaju nukleotida po jednoj alelnoj inačici, što ih čini izrazito nepovoljnim u samoj uporabi u tehničkom smislu. Za postojeće komercijalne setove reagensa potrebno je dogovoriti nomenklaturu alela, koja bi se temeljila na broju ponavljanja (kao kod ljudi), razviti standard za svaki biljeg (engl. *allelic ladder*) i odrediti kontrolni uzorak DNA. U većini razvijenih zemalja utvrđivanje identiteta primjenom postojećih komercijalnih setova reagensa, odnosno spomenutih biljega, uspostavljeno je za njihove populacije goveda. U Hrvatskoj je provedena populacijska studija za goveda s područja sjeverne Hrvatske (51), a prvi put je u sklopu novorazvijenog multiplex STR sustava (12 STR lokusa), za utvrđivanja identiteta goveda, razvijena i integrirana alelna ljestvica (52). Uporaba ovog STR sustava trebala bi značajno povećati vrijednost i preciznost budućih DNA analiza kod goveda, te ih približiti vrijednostima analiza DNA humanog podrijetla.

FORENZIČNA BOTANIKA

Forenzična botanika je kombinacija više disciplina biljne biologije i njihove primjene u području zakonodavstva (53). Metode forenzične botanike značajno pridonose u istražnim postupcima, ali njihova je primjena još i sad ograničena na identifikaciju biljnog uzorka i komparaciju analiziranih uzoraka. Biljni materijal s mjesta zločina često je degradiran i morfološki neprepoznatljiv, pa je karakterizacija na molekularnoj razini jedini način detekcije i identifikacije biljne vrste. STR biljezi su visoko individualizirani molekularni biljezi i izvrsni su za analizu biljnih uzoraka kad ih se optimizira za analizu određene biljne vrste. Analiza STR biljega pokazala se učinkovitom u detekciji i identifikaciji različitih sojeva marihuane (*Cannabis sativa* L.).

Najčešće primjenjivani nasumični biljezi u forenzičnim analizama biljnih uzoraka su nasumično umnoženi polimorfni DNA (prema engl. *Randomly Amplified Polymorfed DNA* – RAPD) i umnoženi fragmenti DNA-a različitih dužina (prema engl. *Amplified Fragment Length Polymorphism* – AFLP). RAPD analiza često se primjenjuje u botaničkoj forenzici za povezivanje žrtve i mjesta zločina (54), za neovlaštenu komercijalizaciju biljaka prilikom patentiranja biljnih proizvoda (55) te za analizu želučanog sadržaja žrtve (56). AFLP je metoda za genotipizaciju biljnih uzoraka iz jednog izvora (57). U forenzičnim analizama AFLP metoda se primjenjuje za individualizaciju uzoraka marihuane, ali i za povezivanje uzgajivača, distributera i konzumenata marihuane (58).

Identifikacija biljne vrste je prvi nužan korak kad se nastoji utvrditi forenzična povezanost, a potom se provodi individualizacija ako je na raspolaganju dostatan uzorak za testiranje DNA (53).

Analiza peluda ili palinologija je korisna u otkrivanju forenzičkih veza i utvrđivanju vremena smrti. Pelud isto tako može biti korisna u slučajevima kao što su ubojstvo, seksualni i fizički napad, krivotvorina, oružana pljačka ili raspačavanje droge (58).

BIOTERORIZAM I FORENZIČNA MIKROBIOLOGIJA

Bioterorizam podrazumijeva uporabu mikroorganizama ili njihovih toksina s nakanom ozljeđivanja, razbolijevanja ili ubijanja ljudi ili životinja, zbog osobnih, političkih ili socijalnih razloga (59). Forenzična mikrobiologija relativno je nova znanstvena disciplina koja se primjenjuje za analizu mogućih bioterorističkih napada ili nenamjernih oslobađanja mikroorganizama i njihovih toksina (60).

Američki centri za kontrolu bolesti (prema engl. *Centers for Disease Control and Prevention* - CDC) sve su mikroorganizme koji bi se potencijalno mogli rabiti u bioterorističke svrhe klasificirali u tri kategorije (59). Identifikacija osoba koje su

skrivile bioteroristički napad namjerno ili zbog nepažnje zahtijeva rigoroznu uporabu suvremenih mikrobioloških analitičkih metoda i oruđa, tradicionalnu forenzičnu analizu i obradu, DNA testiranje, uzimanje otisaka prsta i sl. (60). DNA tehnologija za identifikaciju mikroorganizama koja se primjenjuje u bioterorizmu uključuje: sekvenciranje, tehnike mikročipova, uključujući mikročip analizu patogenosti, karakterizaciju SNP biljega, različit broj uzastopno ponovljenih analiza te važne tehnike u karakterizaciji gena odgovornih za rezistenciju na antibiotike. *Ad hoc* skupina Svjetske zdravstvene organizacije (prema engl. *World Health Organization* - WHO) dala je 1998. godine kriterije za proglašavanje epidemija (60, 61). Najbolji pristup za pripravnost u detekciji ili odgovoru na čin bioterorizma je integrirana mreža koju čine vladine institucije, akademska zajednica, industrija i javno zdravstvo (62).

ULOGA DNA KOD ILEGALNOG USELJAVANJA I TRGOVINE LJUDIMA

Pouzdanost DNA kao alata za rješavanje zločina omogućila je različite primjene metoda utvrđivanja identiteta ljudi u brojnim državnim i sudskim procesima te u humanitarne svrhe. Za razliku od biometrijskih identifikacijskih alata poput otisaka prstiju, prepoznavanja šarenice ili glasovnog prepoznavanja, DNA analiza može potvrditi ili opovrgnuti tvrdnje o biološkoj povezanosti između analiziranih osoba. Primjena utvrđivanja identiteta analizom DNA posebno je važna u kontroli graničnih prijelaza i migracijskoj politici, odnosno u borbi suzbijanja nezakonitih useljavanja, nezakonitih posvojenja, prijevara kod useljavanja, utvrđivanja identiteta žrtava trgovine ljudima te žrtava seksualnog i radnog iskorištavanja. Analiza DNA se primjenjuje za pouzdano i učinkovito utvrđivanje identiteta, ali i za utvrđivanje obiteljskih povezanosti. Testiranje uključuje analizu autosomnih STR lokusa i statističku obradu podataka kako bi se odredila međusobna povezanost osoba koje se uspoređuju (63). Kao dodatni alati mogu poslužiti SNP biljezi, Y-vezani biljezi i mtDNA. Za razliku od biometrijskih oznaka DNA ima jedinstvenu ulogu u graničnoj sigurnosti i slučajevima useljavanja koji ovise o navodnoj rodbinskoj povezanosti između podnositelja zahtjeva i korisnika usluge. Zbog velikog broja prijevara u manipuliranju genetičkim profilima osoba (64, 65) kod pokušaja ilegalnog useljenja, trgovini ljudima i sl., pokušalo se na brojne načine unaprijediti sustav kontrole, odnosno otkriti potencijalne prijave. Kroz različite DNA programe, unaprijeđena je suradnja između DNA laboratorija u razmjeni DNA baza podataka, razvijen je model kontrole čitavog procesa prikupljanja DNA uzoraka, kao i same analize u akreditiranim DNA laboratorijima. U istu svrhu uvedena je tehnologija automatske (brze) DNA analize (prema engl. *Rapid DNA analysis*). Za razliku od standardne DNA

analize koja se odvija u više različitih koraka, u vremenskom rasponu od nekoliko sati do nekoliko dana, ovisno o laboratoriju i opremi, automatska DNA analiza učinkovitije obrađuje profile u rasponu od nekoliko minuta do nekoliko sati. Najbrži DNA sustavi za izdvajanje DNA, umnožavanje odabranih lokusa te određivanje alelnih inačica rabe mikrofluidnu tehnologiju u jednom integriranom uređaju. Kao referentni uzorci za analizu na ovom uređaju se primjenjuju bris sluznice usne šupljine i krvna mrlja. Ova tehnologija pruža niz mogućnosti za brzu procjenu identiteta osobe, bez potrebe za njenim dužim zadržavanjem. No javljaju se i određena pitanja, pa je tako nejasno hoće li DNA profili dobiveni na ovakav način biti u skladu s postojećim standardima koji vrijede za DNA profiliranje te hoće li dobiveni profili biti dovoljno kvalitetni za unos u nacionalne baze podataka poput CODIS-ove baze. Kako se zbog provedbe zakona uporaba primjene DNA širi i na građane koji ne pripadaju kriminalnoj populaciji, poput osoba s privremenim boravištem u nekoj zemlji, postavlja se i pitanje je li rutinsko izuzimanje uzoraka tih osoba za DNA analizu ugrožavanje njihove privatnosti i kršenje ljudskih prava (66). DNA programi svakako trebaju definirati određena pravila, poput pravila o dužini zadržavanja prikupljenih uzoraka, jasno definirane ovlasti pristupanja uzorcima te načina njihovog uništavanja. Slični uvjeti su potrebni i za pristup bazama DNA profila. Stoga je osiguravanje socijalno i društveno odgovornog korištenja prikupljenih genetičkih informacija ključ u razvoju modela politike za provedbu DNA testiranja.

DNA FENOTIPIZACIJA

Najnoviji trendovi u forenzičnoj DNA analizi u prvi plan stavljaju genotipizaciju primjenom SNP biljega radi potencijalnog predviđanja pojedinih fenotipskih karakteristika poput boje kože, očiju, kose i drugih (67). Ovaj smjer forenzične genetike je opisan kao DNA fenotipizacija (prema engl. *DNA phenotyping* – FDP). Zasniva se na potrebi sakupljanja što većeg broja informacija radi individualizacije osobe, radi identificiranja posmrtnih ostataka te osobe ili individualizacije osobe koja je ostavila određeni biološki trag. Ovakve informacije mogu biti korisne u slučajevima identifikacije nestalih osoba nepoznatog podrijetla, u nedostatku osnovnih informacija o srodnicima koji bi se mogli potražiti i testirati. DNA fenotipizacija bi mogla također dati polazne informacije o analiziranim fenotipskim karakteristikama počinitelja u slučajevima forenzičkih istraga kad je pronađen biološki trag, kad ne postoje nikakve dodatne informacije o počinitelju (izjave svjedoka i sl.), a generirani DNA profil se ne nalazi u DNA bazi podataka.

Novija istraživanja su uspjela odrediti određene genetičke biljege koji stoje u korelaciji s genetičkom karakterizacijom

osobina poput boje očiju, kose i kože (68). Shodno tome, radi se na uspostavljanju razvijenih multipleksnih sustava baziranih na SNP biljezima koji su pozicionirani u blizini gena, prvenstveno odgovornih za pigmentaciju. Melanin je osnovni pigment odgovoran za boju očiju, kože i kose. Njegova sinteza je ovisna o većem broju gena kao i drugim faktorima poput starosne dobi, lijekovima, bolesti, uvjetima okoliša, pa se pigmentacija smatra kompleksnom osobinom. Analizirano je sedam SNP biljega (rs12913832, rs1545397, rs16891982, rs1426654, rs885479, rs6119471 i rs12203592) radi potencijalnog dokazivanja mogućeg predviđanja pigmentacije. Šest od njih je primijenjeno u predviđanju boje očiju, a svih 7 u analizi boje kože. Stopa pogreške, bez obzira na etničku pripadnost ispitanika, bila je izuzetno mala, što upućuje na to da bi analiza ovih biljega u budućnosti mogla pružati izuzetno korisne informacije u području forenzične istrage. Razvijena su dva SNP sustava nazvana IrisPlex (*Eye-color-predictor-1* i *Eye-color-predictor-2*) koji sadrže po 6 najinformativnijih SNP biljega iz 6 pigmentacijskih gena. Razvijeni SNP sustavi dijele tri zajednička SNP biljega: rs12913832, rs16891982 i rs12203592 (69, 70). No prvenstveno su bazirana na SNP biljevu rs12913832 čija vrijednost predviđanja za boju očiju iznosi 75% (68), a primjenom dodatnih SNP biljega točnost predviđanja se poboljšava.

SNP sustav IrisPlex (*Eye-color-predictor-1*) nedavno je proširen sa 18 novih SNP biljega koji se primjenjuju za predviđanje boje kose. Razvijeni sustav je nazvan HirisPlex, a sastoji se od 24 SNP biljega iz 11 gena. Rezultati studije su pokazali da je postotak točnosti predviđanja plave boje kose iznosio 69,5%, smeđe boje kose 78,5%, crne 87,5% te crvene 80% (71).

Kad govorimo o pigmentaciji, još i sad se traži potencijalno visoko informativna kombinacija SNP biljega (72). Osnovni problem je znatno veći utjecaj vanjskih čimbenika na boju kože nego na boju očiju, te činjenica da različiti SNP biljezi pokazuju različitu informativnost za različite humane populacije. Stoga se razvijaju tzv. kontinentalni SNP sustavi koji će unutar definiranih populacija biti izuzetno informativni. Unatoč spomenutim poteškoćama određeno je 7 SNP biljega koji se mogu primijeniti u određivanju boje kože u svjetskoj populaciji (69).

Uz analizu predviđanja osobina zasnovanih na pigmentaciji u proteklih nekoliko godina su provedene studije koje su ispitivale genetičko određivanje i drugih osobina poput tjelesne visine (73), individualne starosti (74), oblika kose (kovrčava ili ravna kosa) (75), gubitka kose i sl. Sva ova istraživanja su upućivala na izuzetnu kompleksnost analiza fenotipskih osobina, a posebno kvantitativnih osobina s velikim brojem uočenih inačica, pa se istraživanja u ovom smjeru intenzivno nastavljaju.

NOVČANA POTPORA/FUNDING

Nema/None

ETIČKO ODOBRENJE/ETHICAL APPROVAL

Nije potrebno/None

DOPRINOSI AUTORA/DECLARATION OF AUTHORSHIP

Svi autori su jednako doprinijeli u radu/*All authors contributed equally to this paper*

SUKOB INTERESA/CONFLICT OF INTEREST

Autori su popunili *the Unified Competing Interest form* na www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (dostupno na zahtjev) obrazac i izjavljuju: nemaju potporu niti jedne organizacije za objavljeni rad; nemaju finansijsku potporu niti jedne organizacije koja bi mogla imati interes za objavu ovog rada u posljednje 3 godine; nemaju drugih veza ili aktivnosti koje bi mogle utjecati na objavljeni rad./*All authors have completed the Unified Competing Interest form at www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.*

LITERATURA

- Primorac D, Schanfield M, editors. Forensic DNA Applications: An Interdisciplinary Perspective. CRC Press, Taylor & Francis Group; 2014. In press.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature*. 1985;314:67-73.
<http://dx.doi.org/10.1038/314067a0>
PMid:3856104
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual specific "fingerprints" of human DNA. *Nature*. 1985;316:76-9.
<http://dx.doi.org/10.1038/316076a0>
PMid:2989708
- Primorac D, Anđelinović Š, Definis-Gojanović M, et al. Identification of war victims from mass graves in Croatia, Bosnia and Herzegovina by the use of standard forensic methods and DNA typing. *J Forensic Sci*. 1996;41:891-4.
PMid:8789853
- Džijan S, Primorac D, Marcikić M, et al. High estimated likelihood ratio might be insufficient in a DNA-lead process of war victim's identification. *Croat Chem Acta*. 2005;78:393-6.
- Gornik I, Marcikić M, Kubat M, Primorac D, Lauc G. The identification of war victims by reverse paternity is associated with significant risks of false inclusion. *Int J Legal Med*. 2002;116:255-7.
PMid:12376832
- Alonso A, Anđelinović Š, Martin P, et al. DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex strvs stems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croat Med J*. 2001;42:260-6.
PMid:11387635
- International Humane Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860-921.
<http://dx.doi.org/10.1038/35057062>
PMid:11237011
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the Human Genome. *Science*. 2001;291:1304-51.
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1058040>
PMid:11181995
- Primorac D, Marjanović D, ur. Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
- National Research Council. The evaluation of Forensic DNA Evidence. Washington DC: National Academy Press, Washington; 1996.
- Butler JM. Forensic DNA Typing: Biology, Technology and Genetics of STR Markers. 2nd ed. London: Elsevier Academic Press; 2005.
- Federal Bureau of Investigation. The FBI's Combined DNA Index System Program. Quantico: FBI; 2004.
- Altshuler D, Pollara VJ, Cowles CR, et al. An SNP map of the human genome generated by reduced representation shotgun sequencing. *Nature*. 2000;407:513-6.
<http://dx.doi.org/10.1038/35035083>
PMid:11029002
- Welcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447:661-78.
<http://dx.doi.org/10.1038/nature05911>
PMid:17554300 PMCID:PMC2719288
- Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature Genet*. 2003;33:228-37.
<http://dx.doi.org/10.1038/ng1090>
PMid:12610532
- Glazier AM, Nadeau JH, Aitman TJ. Finding genes that underlie complex traits. *Science*. 2002;298:2345-9.
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1076641>
PMid:12493905
- Rhee H, Lee JS. PADB: Published association database. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:348.
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-8-348>
PMid:17877839 PMCID:PMC2039752
- Parsons TJ, Coble MD. Increasing the forensic discrimination of mitochondrial DNA testing through analysis of the entire mitochondrial DNA genome. *Croat Med J*. 2001;42:304-9.
PMid:11387644
- Prinz M. Experience with Using Y Chromosome Specific STRs in Forensic Casework. Proceedings of the 10th International Symposium on Human Identification. Orlando, Florida. Madison, USA: Promega Corporation; 1999.
- Semino O, Passarino G, Oefner PJ, et al. The genetic legacy of paleolithic homo sapiens in extant Europeans: A Y chromosome perspective. *Science*. 2000;290:155-9.
<http://dx.doi.org/10.1126/science.290.5494.1155>
- Marjanović D, Fomarin S, Montagna S, et al. The peopling of modern Bosnia-Herzegovina: Y-chromosome haplogroups in the three main ethnic groups. *Ann Hum Genet*. 2005;69:757-63.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00190.x>
PMid:16266413
- Barac L, Peričić M, Klarić IM, et al. Y chromosomal heritage of Croatian population and its island isolates. *Eur J Hum Genet*. 2003;11:535-42.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200992>
PMid:12825075
- Primorac D, Marjanović D, Vilems R, Underhill PA. Croatian genetic heritage: Y-chromosome story. *Croat Med J*. 2011;52:225-34.
<http://dx.doi.org/10.3325/cmj.2011.52.225>
PMid:21674820 PMCID:PMC3118711
- Santos FR, Pandya A, Tyler-Smith C. Reliability of DNA-based sex tests. *Nat Genet*. 1998;18:103.
<http://dx.doi.org/10.1038/ng0298-103>
PMid:9462733
- Prinz M, Sansone M. Y chromosome-specific short tandem repeats in forensic casework. *Croat Med J*. 2001;42:288-91.
- Szibor R, Krawczak M, Hering S, Edelmann J, Kuhlisch E, Krause D. Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int J Legal Med*. 2003;117:67-74.
PMid:12690502
- Edelmann J, Lessig R, Klintschar M, Szibor R. Advantages of X chromosomal microsatellites in paternity testing: Presentation of cases. *Int Congress Series*. 2004;1261:257-9.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0531-5131\(03\)01722-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0531-5131(03)01722-9)

29. Szibor R. X-chromosomal markers: past, present and future. *Forensic Sci Int Genet.* 2007;1:93-9.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.03.003>
PMid:19083736
30. Gršković B, Zidkova A, Stenzl V, Popović M, Primorac D, Mršić G. Analysis of 8 X-chromosomal markers in the population of central Croatia. *Croat Med J.* 2013;54:238-47.
<http://dx.doi.org/10.3325/cmj.2013.54.238>
PMid:23771754 PMCID:PMC3692332
31. Diegoli TM, Kovacevic L, Pojskic N, Coble MD, Marjanovic D. Population study of fourteen X chromosomal short tandem repeat loci in a population from Bosnia and Herzegovina. *Forensic Sci Int Genet.* 2011;5:350-1.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.01.007>
PMid:20457077
32. Michaels GS, Hauswirth WW, Laipis PJ. Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells. *Dev Biol.* 1982;94:246-51.
[http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606\(82\)90088-4](http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606(82)90088-4)
33. Piko L, Matsumoto L. Number of mitochondria and some properties of mitochondrial DNA in the mouse egg. *Dev Biol.* 1976;49:1-10.
[http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90253-0](http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606(76)90253-0)
34. Wallace DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science.* 1992;256:628-32.
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1533953>
PMid:1533953
35. Manfredi G, Thyagarajan D, Papadopoulou LC, Pallotti F, Schon EA. The fate of human sperm-derived mt DNA in somatic cells. *Am J Hum Genet.* 1997;61:953-60.
<http://dx.doi.org/10.1086/514887>
PMid:9382109 PMCID:PMC1715995
36. King MP, Attardi G. Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA. *Cell.* 1988;52:811-9.
[http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90423-0](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(88)90423-0)
37. Coble MD, Vallone PM, Just RS, Diegoli TM, Smith BC, Parsons TJ. Effective strategies for forensic analysis in the mitochondrial DNA coding region: characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA: a multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *Int J Legal Med.* 2006;120:27-32.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00414-005-0044-z>
PMid:16261373
38. Parsons TJ, Coble MD. Increasing the forensic discrimination of mitochondrial DNA testing through analysis of the entire mitochondrial DNA genome. *Croat Med J.* 2001;42:304-9.
39. Divne AM, Allen M. A DNA microarray system for forensic SNP analysis. *Forensic Sci Int.* 2005;154:111-21.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.09.134>
PMid:16182957
40. Catts E, Goff M. Forensic entomology in criminal investigations. *Ann Rev Entomol.* 1992;37:253-72.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.001345>
PMid:1539937
41. Greenberg B, Kunich JC. Entomology and the law: flies as forensic indicators. Cambridge: University Press Cambridge; 2002.
42. Wells JD, King L. Incidence of precocious egg development in flies of forensic importance (Calliphoridae). *Pan-Pac Entomol.* 2001;77:235-9.
43. Clery JM. Stability of prostate specific antigen (PSA), and subsequent Y-STR typing, of *Lucilia* (Phaenicia) sericata (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) maggots reared from a simulated postmortem sexual assault. *Forensic Sci Int.* 2001;120:72-6.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0379-0738\(01\)00429-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0379-0738(01)00429-7)
44. Verma SK, Singh L. Novel universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application. *Mol Ecol Notes.* 2003;3:28-31.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00340.x>
45. Jobling MA, Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet.* 2004;5:739-51.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrg1455>
PMid:15510165
46. Teletchea F, Maudet C, Hanni C. Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends Biotechnol.* 2005;23:359-66.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.05.006>
PMid:15927295
47. Menotti-Raymond M, David VA, O'Brien SJ. Pet cat hair implicates murder suspect. *Nature.* 1997;386:774.
<http://dx.doi.org/10.1038/386774a0>
PMid:9126735
48. Kanthaswamy S. Development and validation of a standardized canine STR panel for use in forensic casework. Final report for NIJ Grant 2004-DN-BX-K007. 2009. <http://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/226639.pdf>.
49. Tom BK, Koskinen MT, Dayton M, et al. Development of a nomenclature system for a canine STR multiplex reagent kit. *J Forensic Sci.* 2010;55:597-604.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01361.x>
PMid:20345775
50. van de Goor LHP, van Haeringen WA. Identification of stolen cattle using 22 microsatellite markers. *Nonhuman DNA Typing: Theory and Casework Applications* (edited by Heather Miller Coyle). Boca Raton, CRC Press; 2007.
51. Projić P, Novokmet M, Lauc G, et al. Population studies at 11 polymorphic STR loci in a bovine sample from northern Croatia. Abstract. Proceedings of the seventh ISABS conference in forensic, anthropologic and medical genetics and Mayo Clinic lectures in translational medicine. 2013 February 24; http://www.isabs.hr/PDF/ISABS_2011_abstract_book_web.pdf.
52. Projić P. Razvoj metoda za analizu DNA mikrosatelita i njihova primjena za identifikaciju goveda. Doktorska disertacija, Zagreb; Prirodoslovno-matematički fakultet. 2013:96.
53. Miller Coyle M, Palmbach TM. Forenzična botanika: biljke kao dokaz u kriminalističkim slučajevima. U: Primorac D, Marjanović D, ur. *Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu*. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
54. Horrocks M, Walsh KAJ. Fine resolution of pollen patterns in limited space: differentiating a crime scene and alibi scene seven meters apart. *J Forensic Sci.* 1999;44:417-20.
55. Nakamura GR. Forensic aspects of cystolith hairs of *Cannabis* and other plants. *J Assoc Off Anal Chem.* 1969;52:5-16.
56. Cheng LL. DNA and the identification of plant species from stomach contents. In: Coyle HM. *Forensic botany: principles and applications to criminal casework*. Boca Raton, CRC Press; 2005.
57. Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995;23:4407.
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
PMid:7501463 PMCID:PMC307397
58. Miller Coyle H. *Forensic Botany: Principles and Applications to Criminal Casework*. Boca Raton, CRC Press; 2005.
59. Centers for Diseases Control, CDC. 2013. Bioterrorism Agents/Diseases. <http://www.bt.cdc.gov/Agent/agentlist.asp>.
60. Breeze RG, Budowle B, Schutzer SE, Keim P, Morse S, editors. *Microbial forensics*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2011.
61. Dando M, Pearson GS, Kriz B, editors. Scientific and technical means of distinguishing between natural and other outbreaks of disease. Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop. Prague, Czech Republic; 1988.
62. Budowle B, Beaudry JA, Barnaby NG, Giusti AM, Bannan JD, Keim P. Role of law enforcement response and microbial forensics in investigation of bioterrorism. *Croat Med J.* 2007;48:437-49.
63. Debenham P. DNA fingerprinting, paternity testing and relationship (immigration) analysis. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd; 2006.
<http://dx.doi.org/10.1038/npg.els.0005202>

64. Wenk RE. Sporadic genotype recycling fraud in relationship testing of immigrants. *Transfusion*. 2010;50:1852-3.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02657.x>
PMid:20883256
65. Wenk RE. Detection of genotype recycling fraud in U.S. immigrants. *J Forensic Sci*. 2011;56 (Suppl 1):S243-6.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01576.x>
PMid:20950312
66. Henning AC. Compulsory DNA collection: a fourth amendment analysis. Edited by Congressional Research Council; 2010.
67. Wurmbach E. Prediction of physical characteristics, such as eye, hair and skin color based solely on DNA. In: Primorac D, Schanfield M, eds. *Forensic DNA Applications: An Interdisciplinary Perspective*. CRC Press, Taylor & Francis Group; 2014. In press.
68. Valenzuela RK, Henderson MS, Walsh MH, et al. Predicting phenotype from genotype: normal pigmentation. *J Forensic Sci*. 2010;55:315-22.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01317.x>
PMid:20158590 PMCID:PMC3626268
69. Spichenok O, Budimlija ZM, Mitchell AA, et al. Prediction of eye and skin color in diverse populations using seven SNPs. *Forensic Sci Int Genet*. 2011;5:472-8.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.10.005>
PMid:21050833
70. Walsh S, Liu F, Ballantyne KN, van Oven M, Lao O, Kayser M. IrisPlex: A sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. *Forensic Sci Int Genet*. 2011;5:170-80.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.02.004>
PMid:20457092
71. Walsh S, Liu F, Wollstein A, et al. The HlrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Sci Int Genet*. 2013;7:98-115.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.07.005>
PMid:22917817
72. Kayser M, de Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat Rev Genet*. 2011;12: 179-92.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrg2952>
PMid:21331090
73. Aulchenko YS, Struchalin MV, Belonogova NM, et al. Predicting human height by Victorian and genomic methods. *Eur J Hum Genet*. 2009;17:1070-5.
<http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2009.5>
PMid:19223933 PMCID:PMC2986552
74. Estrada K, Krawczak M, Schreiber S, et al. A genome-wide association study of northwestern Europeans involves the C-type natriuretic peptide signaling pathway in the etiology of human height variation. *Hum Mol Genet*. 2009;18:3516-24.
<http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddp296>
PMid:19570815 PMCID:PMC2729669
75. Eriksson N, Macpherson JM, Tung JY, et al. Web-based, participant-driven studies yield novel genetic associations for common traits. *PLoS Genet*. 2010;6:e1000993.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000993>
PMid:20585627 PMCID:PMC2891811

SUMMARY

Forensic DNA application: an interdisciplinary perspective

Petar Projić, Gordan Lauc, Dragan Primorac

The DNA analysis today undoubtedly has an irreplaceable role in all forensic sciences. The discovery and application of STR molecular markers has significantly improved forensic DNA analysis. The tetranucleotide STR markers are best studied and most commonly included into the analysis of individual and population diversity. The use of SNP molecular markers is one of the more recent approaches in population-genetic studies, medical diagnosis and identity testing. The largest part of the SNPs is an integral part of noncoding region of the genome, for this reason being considered as selectively neutral. However, there is a certain number of SNPs located within the coding region of the genome (cSNP) and they can influence the development of various multifactorial diseases. As opposed to autosomal markers, which vary through generations, Y-linked and mitochondrial markers pass through generational barriers unchanged (in the absence of mutations). For this reason, they are often used in population, human and forensic genetics for tracing parental lineage. Y parental chromosome plays an important role in the cases of rape as well as in identification of migration of certain nations. With the development of molecular methods over the past years, the role of DNA analysis in animal and plant forensics has become very notable. The number of cases in which traces of animal and plant origin are used as evidence has increased significantly. DNA technology also plays an important role in identification of microorganisms that could be used for bioterrorist attacks. The application of identity determination by DNA analysis is especially important for revealing the victims of human trafficking, sexual and labor abuse, as well as in combating illegal immigration and illegal adoptions. The latest trend in the field of forensic genetics is DNA phenotyping. The use of SNP markers in the process of individual genotyping serves to anticipate certain phenotypic characteristics such as the color of the skin, eyes, hair and alike, in order to establish the identity of the remains or individualization of a person who has left a biological trace.

Keywords: biometric identification; biological markers; forensic medicine; bioterrorism; emigration and immigration