DNA profiliranje i baze podataka

Popović, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:227:855715

Rights / Prava: Attribution-ShareAlike 4.0 International/Imenovanje-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

SVEUČILIŠTE U SPLITU

SVEUČILIŠNI ODJEL ZA FORENZIČNE ZNANOSTI

Repository / Repozitorij:

Repository of University Department for Forensic Sciences

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA
FORENZIČNE ZNANOSTI

FORENZIČNA KEMIJA I
MOLEKULARNA BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD

DNA PROFILIRANJE I BAZE PODATAKA

PETRA POPOVIĆ

Split, prosinac 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA
FORENZIČNE ZNANOSTI

FORENZIČNA KEMIJA I
MOLEKULARNA BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD

DNA PROFILIRANJE I BAZE PODATAKA

Mentor: prof. dr. sc. Damir Marjanović
Komentor: Josip Crnjac, prof. biol.

Petra Popović

Broj indeksa: 374/2016

Split, prosinac 2018.

Rad je izrađen u Laboratoriju za forenzičnu genetiku i biologiju

pod nadzorom prof. dr. sc. Damira Marjanovića i prof. biol. Josipa Crnjca

u vremenskom razdoblju od 27. rujna 2018. do 29. studenog 2018.

Datum predaje diplomskog rada: 23. studenog 2018.

Datum prihvaćanja rada: 29. studenog 2018.

Datum usmenog polaganja: 05. prosinca 2018.

Povjerenstvo: 1. Doc. dr. sc. Ivana Kružić

2. Dr. sc. Snježana Štambuk

3. Doc. dr. sc. Nina Mišić Radanović

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1. 1. Povijesni pregled DNA profiliranja 1
1. 2. Uloga DNA u kriminalistici i forenzici 3
2. CILJ 4
3. METODE I NAČINI ANALIZE DNA U FORENZICI 5
3. 1. STR-*Short Tandem Repeats* molekularni markeri 5
3. 2. DNA profil 6
3. 3. Prvi monolokusni komercijalni sustavi 7
3. 4. Komercijalni autosomalni multipleksni PCR-bazirani STR sustavi 8
3. 4. 1. POWERPLEX ™ 16 SYSTEM 9
3. 4. 2. AMPFISTR® IDENTIFILER ™ PCR AMPLIFICATION KIT 10
3. 4. 3. Investigator IDplex Kit 11
3. 4. 4. PowerPlex™ ESX i ESI SYSTEM 11
3. 4. 5. AmpFISTR® NGM Select PCR Amplification Kit 12
3. 4. 6. Investigator ESSplex Kit 13
3. 5. MiniSTR multipleksni sustavi 13
3. 6. Direktni amplifikacijski STR sustavi 14
3. 7. Y-STR komercijalni multipleksni sustavi 16
3. 8. Mitohondrijska DNA i njena primjena u komercijalnim multipleksnim sustavima 16
3. 9. X-STR markeri i komercijalni multipleksni sustavi 17
4. DNA FENOTIPIZACIJA 19
5. DNA BAZE PODATAKA 21
5. 1. Kriteriji za kreiranje baze 21
5. 2. Uklanjanje profila iz baze podataka 22
5. 3. Baze podataka u svijetu i njihov kapacitet 22
5. 4. CODIS baza podataka (SAD) 23
5. 5. Engleska NDNAD baza podataka 25
5. 6. DNA baza podataka u Njemačkoj 26
5. 7. INTERPOL baza podataka 27
5. 8. Europski set lokusa (ESS) i razmjena informacija 27
5. 9. Baze podataka u Hrvatskoj 28

6. REZULTATI I RASPRAVA 30
7. ZAKLJUČCI 32
8. LITERATURA 33
9. SAŽETCI 35
10. ŽIVOTOPIS 38

1. UVOD

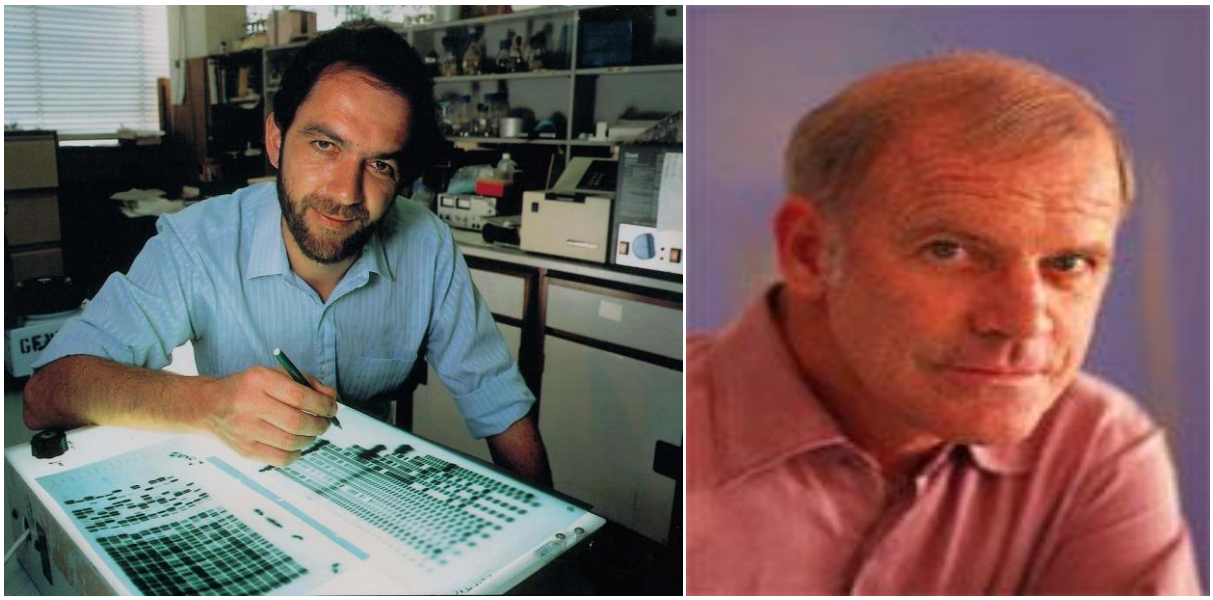
1. 1. Povijesni pregled DNA profiliranja

Nakon što je prošlo pola stoljeća od otkrića molekularne strukture DNA kao i njene uloge temeljnog nosioca nasljedne informacije, ona je postala najpoznatija organska komponenta u širokom spektru brojnih znanstvenih disciplina. Najpoznatija metoda koju vežemo uz pojam DNA analize u forenzici je *DNA fingerprinting* ili *DNA profiliranje* (eng. *DNA typing*).

DNA profiliranje se u forenzici temelji na fundamentalnim principima i koristi tehnike koje se također primjenjuju u svakodnevnoj rutini medicinske dijagnostike, kao i u različitim populacijsko-genetičkim istraživanjima. Osnova ove molekularne metode je analiza osnovnog svojstva svih živih bića, tj. molekularne bioraznolikosti jer je samo 0,1% DNA različit među ljudskim genomima. Karakteristika svih genetičkih metoda je da se na osnovi vrlo malih količina DNA prisutne u promatranom biološkom uzorku može, sa velikom sigurnošću, utvrditi genetički identitet osobe kojoj taj biološki trag pripada (1).

Prvi put se pojam DNA profiliranja spominje 1985. godine u znanstvenom radu poznatog engleskog genetičara Aleca Jeffreysa koji je otkrio da određene regije ljudskog genoma sadrže DNA sekvence koje se sukcesivno ponavljaju. Također je došao do otkrića da broj ponavljajućih sekvenci tj. repetitivnih jedinica, može individualno varirati unutar populacije. Upravo razvijanjem metoda kojima se ispitivala varijacija duljine tih repetitivnih sekvenci, kreirala se čitava znanstvena disciplina-forenzična genetika, čija je osnova DNA profiliranje. Ponavljajuće sekvence su danas poznatije pod imenom VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*) polimorfni markeri. U svrhu otkrivanja ovih sekvenci dr. Jeffreys je koristio metodu RFLP (eng. R*estriction Fragment Length Polymorphism*) koja se zasniva na uporabi restrikcijskih enzima koji izrezuju mjesta u DNA molekuli na kojima se nalaze VNTR markeri. Ova metoda je prvi put korištena u svrhu rješavanja slučaja imigracije u Engleskoj, a nedugo zatim i u rješavanju slučaja dvostrukog ubojstva koje se često spominje i kao 'Colin Pitchfork Case' (2). Od tada se razvoj DNA profiliranja ubrzao i doveo do saznanja o postojanju STR (*Short Tandem Repeats*) markera koje koristimo i danas. Osim otkrića molekularnih markera, jedan od najznačajnijih noviteta koji je omogućio razvoj genetike i forenzične genetike, zasigurno je metoda PCR (eng. *Polymerase Chain Reaction*) ili lančana reakcija polimerazom koja se usavršavala 80-ih godina prošlog stoljeća pod vodstvom Kary Mullis-a. Naime, upravo ovim iskorakom u DNA profiliranju, postalo je moguće analizirati

biološke uzorke koji sadrže minimalne količine DNA. Početkom ovog stoljeća, zabilježena je upotreba najnovijih markera pod imenom SNP (eng. *Single Nucleotide Polymorphism*) za koje se trenutno pretpostavlja da će uvelike doprinijeti napretku biotehnologije, povećati upotrebu i vrijednost mitohondrijske DNA kao i molekularnih markera vezanih za spolne kromosome. Postojeći STR markeri pomogli su kreiranju miniSTR markera koji su omogućili analizu vrlo malih količina visokodegradirane DNA koja se nerijetko pronađe u biološkim uzorcima na mjestu događaja. Trenutačni razvoj DNA profiliranja usmjeren je u pravcu fenotipizacije, tj. pretpostavke osnovnih fenotipskih karakteristika osobe kojoj pripada određeni biološki trag, oslanjajući se prvenstveno na analizu SNP markera (1).



Slika 1. Sir Alec Jeffreys (lijevo) koji je zaslužan za otkriće VNTR markera i dr. Kary Mullis (desno) koji je uz svoje suradnike uveo PCR metodu u genetiku (izvori: https://www.nlm.nih.gov/visibleproofs/galleries/cases/jeffreys.html;https://aeispeakers.com/speakers/dr-kary-mullis/).

1. 2. Uloga DNA u kriminalistici i forenzici

Prva osoba koja je bila osuđena na temelju DNA dokaza u Velikoj Britaniji je Robert Melias 1987. godine, a iste godine u SAD-u je osuđen Tommy Lee Andrews zbog silovanja. Godine 1992. i 1994. u Virginiji je DNA analizom bioloških tragova došlo do velikog broja oslobađanja nedužnih, ali u pojedinim slučajevima i osude počinitelja smrtnom kaznom (3).

U posljednja dva i pol desetljeća, zabilježen je ogroman porast korištenja DNA kao dokaza u kriminalističkim istragama, ispitivanjima očinstva, identifikaciji žrtava masovnih katastrofa, populacijskim istraživanjima podrijetla naroda te u svrhu pronalaska i potvrde identiteta povijesno značajnih osoba te nestalih. U prilog tome, početkom 1990-ih, američka je vojska od svih vojnih djelatnika prikupila uzorke krvi te ih propisno pohranila u svrhu mogućeg DNA profiliranja ukoliko bude potrebna identifikacija zbog njihovog stradavanja (2).

Dobra laboratorijska praksa, akreditiran forenzični laboratorij, profesionalnost i kvaliteta znanstvenika koji prikupljaju i obrađuju biološki trag, predstavljaju uvjete za pozitivan rezultat DNA profiliranja u obliku relevantnog i validiranog dokaza, podobnog za sud. Slučaj koji je uzdrmao širu javnost upravo zbog manjkavosti u prikupljanju uzoraka sa mjesta događaja, njihove pohrane i obrade, zbog čega je osumnjičeni i oslobođen je slučaj O. J. Simpson iz 1994. godine. Nakon tog slučaja su kompanije koje se bave proizvodnjom laboratorijskih potrepština, dobile gotovo pa neograničene fondove u cilju usavršavanja i razvoja metoda i uređaja za DNA analize (1).

2. CILJ

Cilj ovog rada je prikazati metode i načine analize DNA u forenzici. Također će se opisati i usporediti multipleksni sustavi analize genetičkih lokusa, objasniti koje su prednosti, a koji nedostatci pojedinih multipleks analiza te dati preporuka o njihovom korištenju. Naposljetku će se obrazložiti povezanost multipleks sustava sa bazama podataka te njihova upotreba u forenzici.

3. METODE I NAČINI ANALIZE DNA U FORENZICI

3. 1. STR-*Short Tandem Repeats* molekularni markeri

Genom eukariota sadrži veliki broj markera čije se svojstvo polimorfnosti zasniva na različitom broju ponavljanja poznatog repetitivnog motiva baza. Upravo zbog tog svojstva, STR markeri se uvelike koriste i primjenjuju u forenzičnoj genetici. Sastoje se od iznimno kratkih repetitivnih sekvenci, i to 2-7 baznih parova duljine, koji se na definiranom lokusu ponavljaju određeni broj puta. Taj broj ponavljanja je različit, i varira od osobe do osobe osim kod jednojajčanih blizanaca. Nije neobična situacija da se na nekoliko promatranih STR lokusa kod dviju osoba pronađu identične alelne varijante, pa se iz tog razloga komercijalni multipleksni STR sustavi dizajniraju na minimalno 15 promatranih STR lokusa (4). Ono što se smatra zapravo najvećom vrijednošću ovog markera je (1):

- jednostavnost,
- brzina samog procesa,
- mogućnost istovremenog promatranja većeg broja STR markera u multipleks STR sustavima (visok stupanj individualizacije prilikom identifikacije tragova).

U analizama se najčešće koriste tetranukleotidni STR lokusi, ali ponekad to budu i tri- i pentanukleotidni sustavi. Vrlo je čest slučaj kada se pruža mogućnost simultane analize tetra i penta lokusa, čime se postižu rezultati s visokom razinom indeksa isključivanja. Osobine koje su podobne za STR lokus su:

- izražena heterozigotnost,
- mala molekularna težina,
- jasno definirane repetitivne jedinice,
- jasno determinirane alelne varijante,
- jednostavna i pouzdana amplifikacija.

U listopadu 1997. godine ISFH komisija (eng. *International Society of Forensic Haemogenetics*) je dopunila i uvela nomenknaturu STR lokusa i alelnih varijanti koja se i danas koristi. U imenu STR lokusa D21S11 se nalaze opisane četiri njegove osobine, a to su: radi se o DNA markeru, smještenom na 21. kromosomu, koji je prisutan u samo jednoj kopiji, na samo jednom mjestu u genomu (eng. *single copy*-S), te da je to 11. otkriveni i kategorizirani marker na 21. kromosomu. Ukoliko se marker pojavljuje na više mjesta u genomu onda umjesto oznake slova S ide oznaka slova Z.

Nomenklatura alelnih varijanti bazira se na broju repetitivnih jedinica. Npr. ukoliko se alelna varijanta sastoji od 32 ponavljajuća (repetitivna) niza, onda se označava sa brojem 32. Međutim, ukoliko alelna varijanta nema cijeli broj ponavljajućih sekvenci, te još jedan dio niza u vidu nekoliko baza npr. 2, onda se označava kao 32.2. Broj 32 predstavlja broj potpunih ponavljajućih nizova, a 2 broj baza nekompletnog ponavljajućeg niza. Mikrovarijante su alelne varijante koje sadrže i nekompletni dio repetitivne sekvence (4).

3. 2. DNA profil

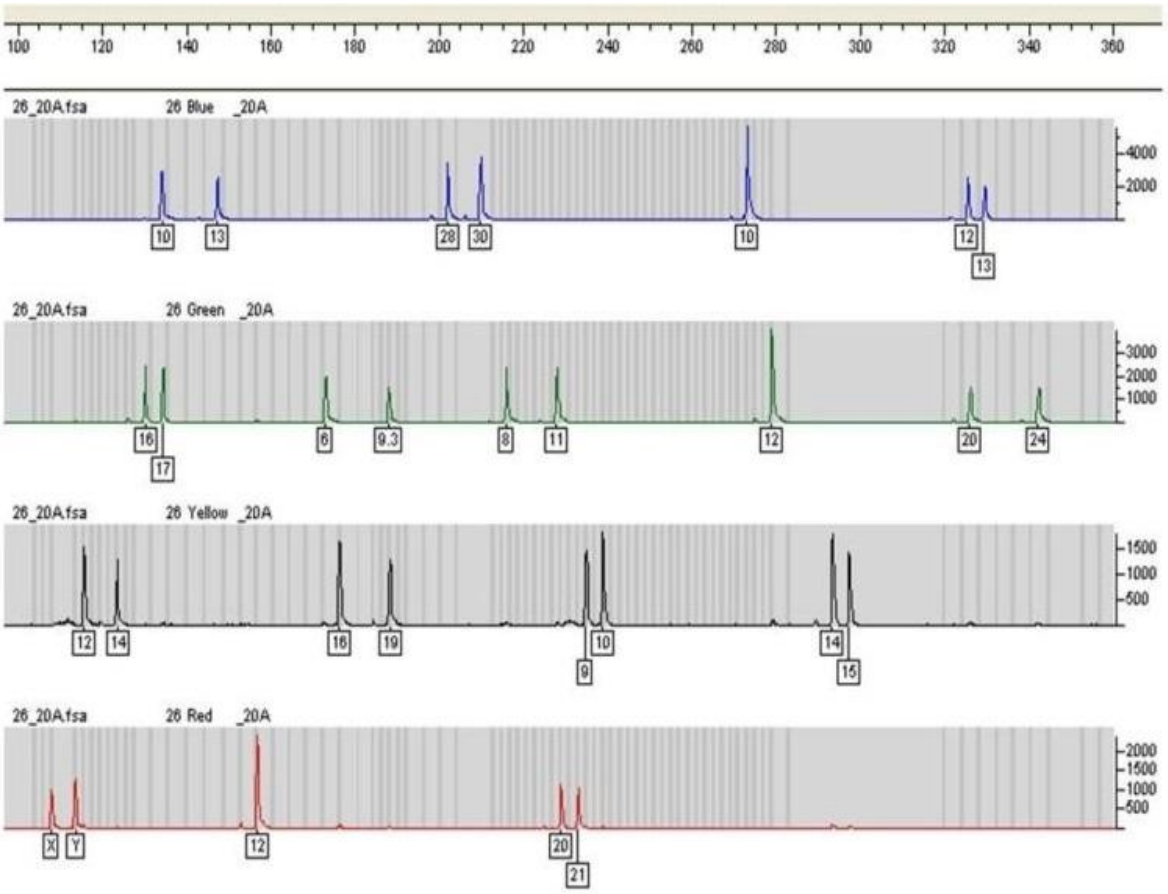
Kao krajnji rezultat detekcije alelnih varijanti na analiziranim STR lokusima dobije se elektroferogram (DNA profil), a izgled elektroferograma može varirati u ovisnosti analiziranih lokusa (autosomalnih ili spolnih markera) kao i o bojama koje su korištene i sličnim kriterijima. Elekroferogram sadrži kombinaciju kompjuterski detektiranih alelnih varijanti u obliku jasno pozicioniranih pikova. Alelne varijante se prvo detektiraju u softveru, a potom i imenuju. Svaki pik je označen brojem koji predstavlja broj ponavljanja repetitivne jedinice unutar analiziranog STR lokusa.

Za dobru analizu elektroferograma je potrebno iskustvo, znanje i preciznost kako bi se moglo ocijeniti je li elektroforeza pravilno protekla, odrediti količinu DNA u uzorku, prepoznati miješane profile kao i kompletne i parcijalne.

Amelogenin je gen koji je odgovoran za sintezu proteina koji je osnovna komponenta matriksa zubne cakline, a također je lociran na spolnim kromosomima. Zbog duljinskog polimorfizma među X i Y kromosomima, koristi se u determinaciji spola u DNA profiliranju. Ukoliko se radi o kombinaciji XY riječ je o muškom DNA profilu, a ukoliko imamo XX kombinaciju možemo sa sigurnošću reći da imamo ženski DNA profil (1).

Kod autosomalnih STR lokusa i X-vezanih STR lokusa kod žena, heterozigoti se detektiraju u obliku dva pika, a homozigoti sa jednim pikom. Elektroferogrami Y-STR lokusa ne mogu imati heterozigotne kombinacije upravo iz razloga jer predstavljaju haplotipove kao rezultate samo jednoga kromosoma, a ne para kromosoma (3).

DNA profili se trenutačno ne koriste za procjenu zdravstvenog stanja, no neki pokazatelji predispozicija za određenu vrstu bolesti će se vjerojatno u budućnosti otkriti u dijelu genoma koji se često naziva ″junk DNA″ (5).



Slika 2. Primjer elektroferograma koji predstavlja DNA profil muške osobe (izvor: https://atlasofscience.org/donor-in-recipient-dangers-in-dna-profiling-after-allotransplantation/).

3. 3. Prvi monolokusni komercijalni sustavi

Razvijanjem forenzičnih analiza ustanovljeni su brojni nedostatci i ograničenja RFLP pristupa u analizi VNTR markera. Zbog nemogućnosti simultane analize više markera, potrebe za velikom količinom DNA u uzorcima, kompleksnosti i dugotrajnosti analize javljala se potreba za standardizacijom i usavršavanjem procedure te su se tako pojavili i prvi komercijalni PCR kompleti ili sustavi. Monolokusni sustav, *AmpliFLP™ D1S80 PCR Amplification Kit*, poznat i pod nazivom D1S80, predstavljao je analizu istoimenog, jednog, ali polimorfnog VNTR lokusa. Međutim, iako snaga diskriminacije nije bila velika, ovaj sustav se u kombinaciji sa drugim sustavima pokazao kao dovoljno informativan u vrijeme prvih forenzičnih DNA analiza. Prvi komercijalni PCR sustav korišten u forenzici je *AmpliType® PM+DQA1 PCR*

Amplification and Typing Kit, koji je usavršavanjem i kombinacijom PCR metode i *dot blot* analize obuhvatio šest lokusa i time povećao snagu diskriminacije (1).

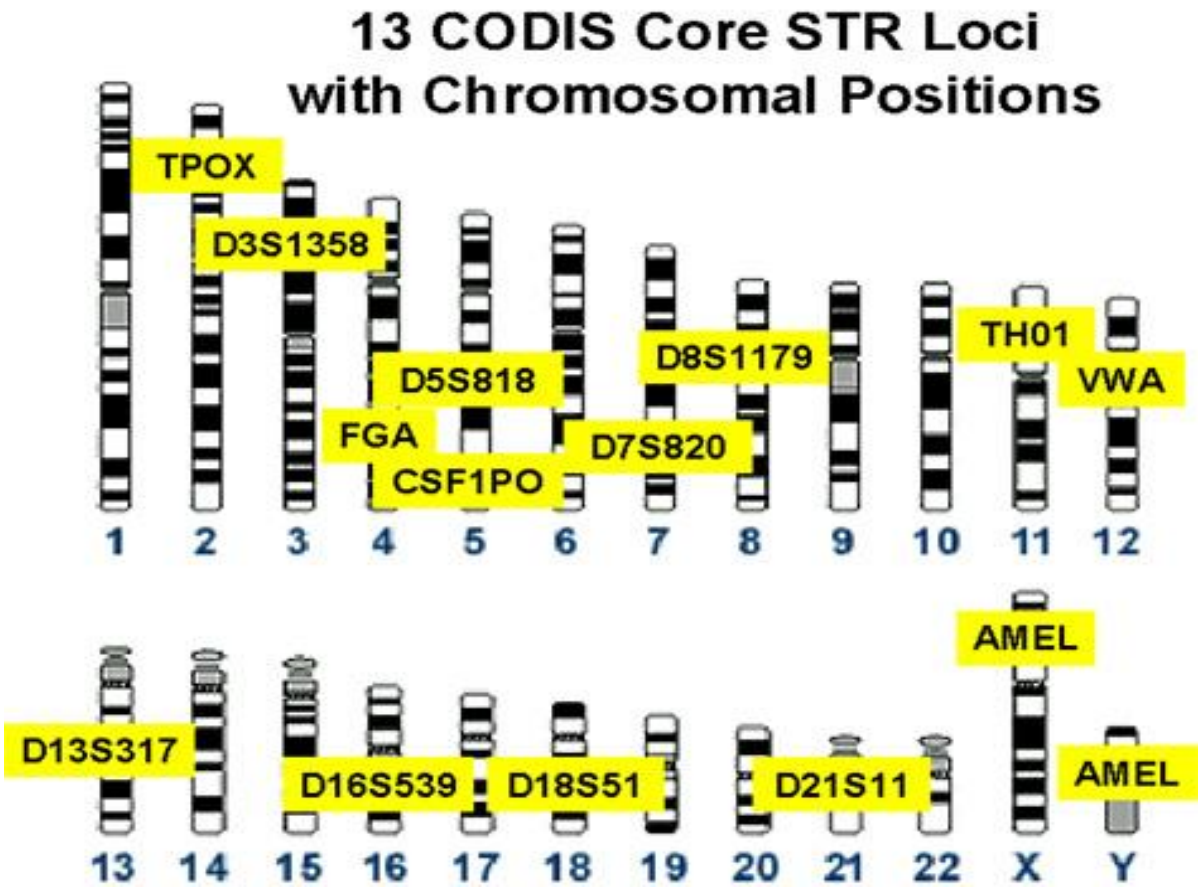
3. 4. Komercijalni autosomalni multipleksni PCR-bazirani STR sustavi

Današnji komercijalni kompleti su kreirani tako da simultano mogu analizirati više autosomalnih STR lokusa, i to u ovome trenutku najviše 29 (6). Postoje tri najveća i najpoznatija proizvođača ovih kompleta: *Promega Corporation*, *Applied Biosystem*-AB i *Qiagen*. Prva dva proizvođača su iz SAD-a, a posljednji je iz Njemačke. Početak proizvodnje se bilježi već 1993. godine kada su se proizvodili i monopleksni sustavi, ali se pravi vrhunac zapravo postiže u kasnim 90-im godinama dvadesetog stoljeća (4). Odlika kvalitetnog multipleksnog sustava sadržana je u njegovoj jednostavnosti i mogućnosti uporabe u svim forenzično-genetičkih laboratorijima. Napretkom tehnologije i razvojem sustava počeli su se primjenjivati i upotrebljavati lokusi koji su po svojim tehničkim i statističkim karakteristikama bili podobni za forenzične analize. U komercijalne multipleksne STR lokuse bili su odabrani lokusi koji (1):

- imaju diskriminacijsku snagu veću od 0,9 i uočenu heterozigotnost veću od 70%,
- imaju jasno izdvojenu i samostalnu kromosomsku lokaciju te koji nisu genetički povezani sa drugim lokusima,
- se mogu jasno multiplicirati u kombinaciji s drugim markerima,
- imaju nisku stopu mutacije,
- posjeduju alele čija se duljina kreće od 90 do 500 baznih parova.

Često su u komercijalnim sustavima zastupljeni tzv. CODIS lokusi, i to njih 13. Vjerojatnost da će dvije osobe koje nisu u srodstvu, imati identične varijante na tih 13 lokusa, izražena je kao jedan prema milijardu (7).

U sljedećim poglavljima je pregled nekih od najpoznatijih komercijalnih kompleta autosomalnih i spolnih multipleksnih sustava za analizu DNA.



Slika 3. Prikaz 13 CODIS STR markera sa njihovim kromosomskim pozicijama (izvor: https://quantumjk.blogspot.com/2015/09/principi-dna-fingerprinting-u-forenzici.html).

3. 4. 1. POWERPLEX™ 16 SYSTEM

PowerPlex™ 16(Promega, 2001) je dvokomponentni komplet reagensa koji se sastoji od:

- preamplifikacijske komponente: Gold Star 10x pufer, *PowerPlex™ 16* 10x Primer Pair Mix i DNA uzorak kao pozitivna kontrola;
- postamplifikacijske komponente: *PowerPlex® 16* Allelic Ladder Mix, Internal Lane standard (ILS) 600 i Blue Dextran Loading Solution.

Moguće ga je koamplificirati i trobojno detektirati na 16 lokusa (15 STR lokusa i amelogenin). Sastoji se od 13 STR tetranukleotidnih lokusa (tzv. standardnih CODIS lokusa) i 2 pentanukleotidna lokusa. Postoje tri kompleksa početnica:

- početnice obilježene fluoroscinom (FL-plava boja) za lokuse: *Penta E, D18S51, D21S11, TH01* i *D3S1358*;
- početnice obilježene karboksitetrametilrodaminom (TMR-žuta boja) za lokuse: *FGA, TPOX, D8S1179,* vWA i AMELOGENIN;
- početnice obilježene 6-karboksi-4',5'-dikloro-2',7'-dimetoksi fluorescin (JOE-zelena boja) za lokuse: *Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820,* D13S317 i D5S818.

Internal Lane Standard (ILS) služi za analizu veličina fragmenata. Sastoji se od 22 umjetno sintetizirana jednolančana DNA fragmenta koji su rangirani u duljini 60-600 baznih parova. Fragmenti su označeni karboksi-x-rodaminom i detektiraju se crvenom bojom. Ovaj standard određuje relativnu migracijsku poziciju svakog fragmenta koja ovisi samo o njegovoj duljini.

PowerPlex™ 16 Allelic Ladder Mix je smjesa velikog broja DNA fragmenata i sadrži sve ranije opisane alelne varijante u kavkazoidnoj populaciji na odabranim lokusima.

Blue Dextran Loading Solution je kemikalija koja se koristi prilikom detekcije na genetičkim analizatorima koji koriste analizu na vertikalnom poliakrilamidnom gelu i za vizualizaciju uzorka pri postavljanju na gel čime se pojačava njegova viskoznost te pospješuje kvaliteta procesa elektroforeze.

Diskriminantna snaga i stupanj individualizacije ovoga multipleksnog sustava opisani su vjerojatnošću postojanja dviju nesrodnih osoba s identičnim alelnim varijantama na 15 STR lokusa zastupljenih u ovom sustavu za kavkazoidno stanovništvo, u iznosu od $1{,}83 \times 10^{-17}$ (1).

3. 4. 2. AMPFISTR® IDENTIFILER™ PCR AMPLIFICATION KIT

AmpFISTR® Identifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, 2005) je multipleksni STR komplet kojim se istovremeno može analizirati 15 STR lokusa, no za razliku od *PowerPlex™16* kompleta reagensa, svi lokusi su tetranukleotidni. Osim 13 CODIS lokusa, sadrži dva dodatna lokusa (D2S1338 I D19S433). Sustav se bazira na postojanju četiri tipa početnica:

- lokusi D8S1179, D21S11, D7S820 i CSF1PO obilježeni plavom bojom 6-FAM,
- lokusi D3S1358, TH01, D13S317, D16S539 i D2S1338 obilježeni zelenom bojom VIC,
- lokusi D19S433, TPOX, vWA i D18S51 obilježeni žutom/crnom bojom NED,

- amelogenin, D5S818 i FGA obilježeni crvenom bojom PET.

U odnosu na prethodno opisani multipleksni sustavu se osim kemijski drukčijih boja dodala i peta boja, narančasta boja LIZ. Tom novom bojom sastava fragmenata duljine do 500 baznih parova, obilježen je interni standard veličine.

Stupanj diskriminacije i individualizacije je izražen u obliku vjerojatnosti da postoje dvije nesrodne osobe s identičnim alelnim varijantama na 15 STR lokusa u ovom sustavu za npr. kavkazoidno stanovništvo SAD-a, u iznosu od $5{,}01 \times 10^{-19}$ (1).

3. 4. 3. Investigator IDplex Kit

Ovaj multipleksni STR sustav (Qiagen, 2010), istovremeno analizira 15 tetranukleotidnih STR lokusa koji su istog sastava kao i kod *Identifiler* sustava opisanog u prethodnom poglavlju. Bazira se na postojanju početnica obojenih u četiri boje i to:

- lokusi amelogenin, TH01, D3S1358, vWA i D21S11 plavom bojom 6-FAM,
- lokusi TPOX, D7S820, D19S433, D5S818 i D2S1338 zelenom bojom BTG,
- lokusi D16S539, CSF1PO, D13S317 i FGA obilježeni žutom/crnom bojom BTY,
- lokusi D18S51 i D8S1179 obilježeni crvenom bojom BTR.

DNA *size standard* se sastoji od 26 sintetiziranih i jednolančanih DNA fragmenata u duljini 60-550 parova baza. Svaki je fragment označen BTO fluorescentnom bojom i detektira se u narančastom spektru (1).

3. 4. 4. PowerPlex™ ESX i ESI SYSTEM

PowerPlex™ ESX i *ESI 16* su sustavi koji se mogu koamplificirati i detektirati u četiri boje na 16 lokusa (15 STR lokusa i amelogenin).

Postoje i njihove verzije u kojima je broj STR lokusa povećan na 17 (*PowerPlex™ ESX 17* i *ESI 17*), jer se osim standardnih i uobičajenih 15 lokusa dodaje i analiza izuzetno informativnog SE33 lokusa. Svi STR markeri u ovim sustavima su tetranukleotidi, osim D22S1045 koji je trinukleotidan.

Standardni sustavi ovoga tipa sa 16 STR lokusa su zapravo kombinacija 8 CODIS lokusa (D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, FGA, TH01, vWA i D16S539), dva lokusa koja se javljaju i u *Identifileru* (D2S441 i D19S433), pet novopreporučenih ESS genetičkih markera (D10S1248, D22S1045, D1S1656, D12S391 i D2S1338) i amelogenin. Koriste se četiri genetičke boje za detekciju: plava (FL), zelena (JOE), žuta/crna (TMR-ET) i crvena (CXR-ET). *Internal size standard* je *PPlex_ILS500* koji se detektira u narančastom spektru i sadrži 21 fragment veličine 60-500 parova baza.

Prednosti *ESX* i *ESI* sustava u odnosu na prethodno objašnjeni *PowerPlex* sustav su u većem broju STR markera koji su veličinom manji od 200 bp pa samim tim spadaju u skupinu miniSTR markera pomoću kojih se može analizirati degradirana DNA, novi PCR pufer koji se smatra manje osjetljivim na prisustvo PCR inhibitora, kao i uključenje novih *ESS* visoko informativnih STR lokusa u kombinaciji sa već poznatim lokusima koji se nalaze i u drugim multipleksnim sustavima.

Zanimljivost leži u činjenici da je *Promega* korporacija prilikom kreiranja ovih sustava napravila modifikacije: u *ESX* verziji novi *ESS* lokusi su u miniSTR modelu (ispod 200 bp), a ostali lokusi u standardnom; u *ESI* verziji je miniSTR model CODIS STR lokusa, a novi *ESS* lokusi te D2S441 i D19S433 u standardnom STR modelu. Ovakav sustav kombinacije je izrazito koristan u slučajevima izuzetno degradirane DNA u uzorcima jer se za isti uzorak kroz dvije reakcije korištenjem ova dva sustava dobiju rezultati na miniSTR lokusima što uz spajanje rezultata u konačnici daje DNA profil na većem broju lokusa (1).

3. 4. 5. AmpFISTR® NGM Select PCR Amplification Kit

AmpFISTR® NGM Select PCR Amplification Kit je multipleksni sustav koji također dopušta koamplifikaciju i četverobojnu detekciju 16 lokusa (15 STR lokusa i amelogenin), a u verziji *AmpFISTR® NGM Select* se ovim STR markerima dodaje i visoko polimorfni SE33 lokus.

Smatra se poboljšanom verzijom *AmpFISTR® SGM Plus™* i sadrži njegovih 10 lokusa (D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, FGA, TH01, vWa, D16S539, D2S1338 i D19S433), pet novopreporučenih *ESS* lokusa (D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656 i D12S391) i to su prva tri u miniSTR modelu. Svi markeri su tetranukleotidni, osim D22S1045 koji je trinukleotidan.

Za detekciju se koriste četiri boje: plava (6-FAM), zelena (VIC), žuta/crna (NED) i crvena (PET). Interni veličinski standard je *500 LIZ Size Standard* ,detekcije u narančastom spektru sa 16 fragmenata raspona 35-500 bp.

U odnosnu na prethodni multipleksni sustav korporacije *Applied Biosystems*, prednost se očituje u većem broju miniSTR markera koji su podobni za analizu degradirane DNA, PCR pufer je manje osjetljiv na prisutnost PCR inhibitora kao i u uključenju novih *ESS* visoko informativnih STR lokusa u kombinaciji sa ostalim standardnim lokusima koji su zastupljeni u multipleksnim sustavima (1).

3. 4. 6. Investigator ESSplex Kit

Kao i prethodno opisani multipleksni sustavi novije generacije, sadrži 15 STR lokusa preporučenih od ENFSI-a i amelogenin. U detekciji su četiri boje: plava (6-FAM), zelena (BTG), žuta/crna (BTY) i crvena (BTR). Interni veličinski standard je *DNA Size Standard 550* koji se detektira u narančastom spektru (BTO boja) te sadrži 26 fragmenata u rasponu od 60-550 bp.

Izuzetno je osjetljiv (uspješno analizirani uzorci i s <1 ng DNA), analizira i degradiranu DNA te uzorke sa prisutnim povećanim koncentracijama PCR inhibitora. Visoko je informativan i u forenzičnom i statističkom aspektu. Na tržište je *Qiagen* poslao i unaprijeđenu verziju u kojoj se pored navedenih lokusa nalazi te analizira i SE33 lokus (1).

3. 5. MiniSTR multipleksni sustavi

MiniSTR molekularni markeri su odlično rješenje za analizu degradiranih uzoraka u forenzičnoj genetici jer oni zapravo predstavljaju modificiranu verziju već postojećih standardnih STR markera, u kojima se početnice vezuju puno bliže njihovom polimorfnom dijelu. Time se smanjuje ukupna molekularna težina (veličina markera izražena u baznim parovima) te se time postiže mogućnost primjene u analizama uzoraka iznimno degradirane DNA. Ovi sustavi su već uvelike upotrebljavani u analizi i identificiranju žrtava terorističkih napada (*World Trade* centar, New York) te u identifikaciji žrtava Drugoga svjetskog rata (1).

Ograničavajući faktor međutim, leži u forenzično-statističkoj informativnosti kroz proces individualizacije biološkog traga. Naime, miniSTR sustavi ne predstavljaju multipleksne STR sustave kao u dosadašnjim poglavljima.

Jedan od najpoznatijih sustava je *AmpFISTR® Minifiler™ PCR Amplification and Typing Kit* od Applied Biosystems korporacije, koji se zasniva na upotrebi četiri boje osam STR lokusa (D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1PO i FGA) i amelogenina. Svi lokusi se nalaze u intervalu 70-283 parova baza. Iskustvo je pokazalo da se uspješni DNA profili mogu dobiti i za manje količine DNA od 100 pg kao i u slučajevima povećanih koncentracija PCR inhibitora (1).

PowerPlex® S5 System je Promegin STR sustav koji koristi dvije boje za detekciju četiri STR lokusa (D18S51, D8S1179, FGA i TH01) i amelogenina. Za to se koriste dvije boje, plava (FL) i zelena (JOE). Interni veličinski standard je ILS sa detekcijom u crvenom dijelu spektra, veličine 60-600 bp. S obzirom da su dva lokusa pozicionirana čak izvan okvira baznih parova za miniSTR sustave, može se reći da se radi o kombinaciji STR genetičkih markera i miniSTR markera. Iako je ovaj sustav u početku zamišljen kao brzi test za količinu i kvalitetu izolirane DNA, uz kombinaciju ranije spomenutog *AmpFISTR® Minifiler™ PCR Amplification and Typing Kit* sustava, uspješno se može koristiti u analizi zahtjevnih bioloških tragova (8).

Nekoliko godina nakon toga, Qiagen je kreirao dva miniSTR sustava: *Investigator Triplex DSF* i *Investigator Triplex AFS QS*. Prvi sustav koristi 3 STR lokusa (D3S1358, SE33 i FGA) u plavom (6-FAM) i zelenom (HEX) spektru. Drugi sustav detektira dva lokusa (FGA i SE33) sa amelogeninom. Nedugo nakon se pojavio još jedan miniSTR sustav, *Investigator Hexaplex ESS* kojim se detektiraju svi novi ESS lokusi (D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391 i D22S1045) sa TH01 i amelogeninom u tri boje: plava (6-FAM), zelena (BTG) i žuta/crna (BTY). Interni veličinski standard je *DNA Size Standard 550* sa detekcijom narančastom spektru. Svi lokusi su u intervalu veličine do 225 bp (1).

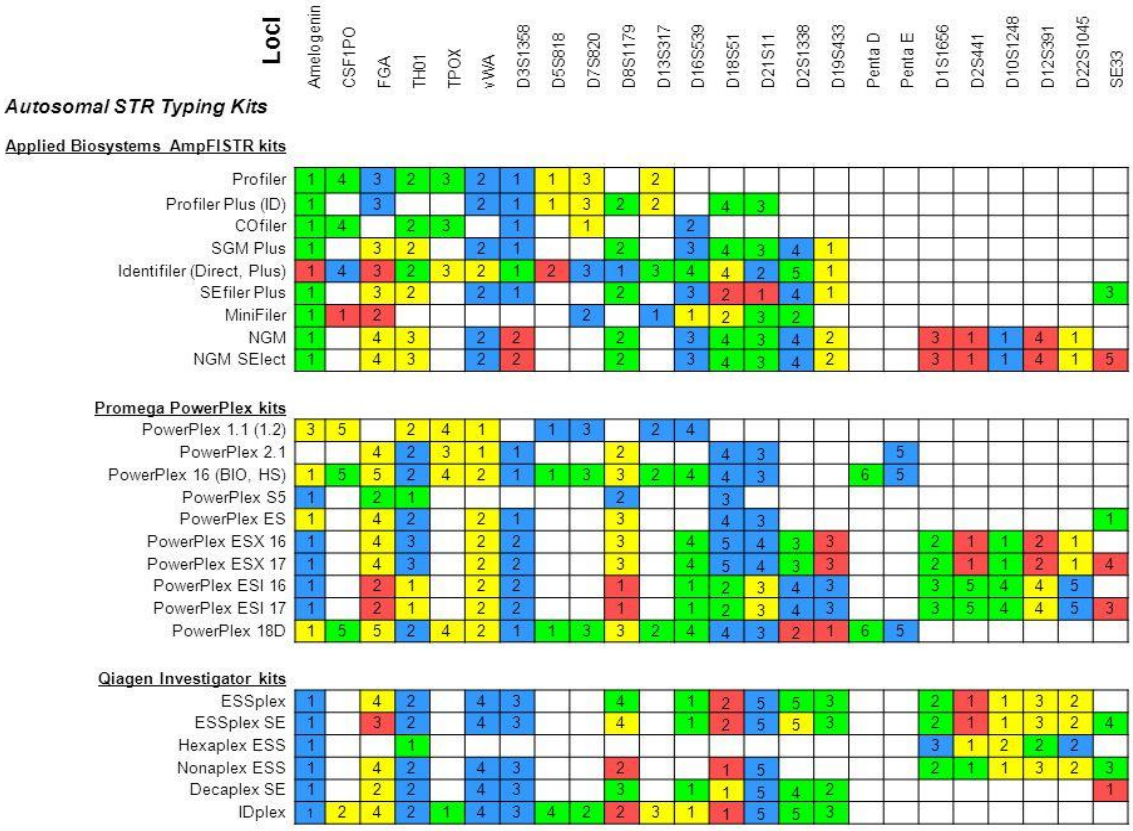
3. 6. Direktni amplifikacijski STR sustavi

U cilju brže, jednostavnije i jeftinije analize bioloških tragova koji su prvenstveno prikupljeni u svrhu kreiranja forenzičnih baza podataka razvile su se procedure koje u potpunosti

zaobilaze izolaciju DNA iz uzoraka. Ovaj model direktnog PCR-a se zasniva na direktnoj amplifikaciji STR markera.

Najpopularnija tri multipleksna STR sustava koji funkcioniraju na ovome modelu su (1):

- *PowerPlex® 18D System* (Promega) pomoću kojeg se odvija direktna amplifikacija 18 STR lokusa od kojih je 13 CODIS lokusa te Penta E, Penta D, D2S1338, D19S433 i amelogenin;
- *AmpFISTR® Identifiler® Direct PCR Amplification Kit* koji se direktno amplificira uz korištenje 15 STR lokusa prisutnih u *Identifiler* sustavu i amelogenina;
- *AmpFISTR® NGM* omogućava direktno amplificiranje 10 STR lokusa koji se nalaze u *AmpFISTR® SGM Plus®* sustavu, dva visoko polimorfna STR lokusa (D1S1656 i D12S391), tri miniSTR lokusa (D10S1248, D22S1045 i D2S441) i amelogenina.



Slika 4. Dio komercijalno najpoznatijih autosomalnih STR multipleksnih sustava sa prikazom markera koji se u njima nalaze i boja kojima su obojeni (izvor: https://slideplayer.com/slide/3508145/).

3. 7. Y-STR komercijalni multipleksni sustavi

Bez obzira na koliko se molekularnih markera radilo tijekom analize, važno je istaknuti da Y-STR profil ne predstavlja potpunu individualizaciju u sudskoj praksi. Y kromosom se nasljeđuje po muškoj liniji, tj. s oca na sina, čime je jasno da isti profil imaju sve muške osobe koje su povezane tom rodbinskom linijom. U slučaju podudaranja Y-STR profila iz uzoraka, navedena osoba se ne može isključiti kao potencijalni donor biološkog uzorka koji se analizira. Također, uz to se najčešće prilože podatci o relativnoj frekvenciji pojavljivanja tog Y-STR profila, odnosno haplotipa u konkretnoj kao i regionalnoj te svjetskoj populaciji (4).

Na tržištu su najpoznatiji i najviše se koriste (1):

- *PowerPlex® Y* (Promega) multipleksni Y-STR komplet čijom se primjenom može analizirati 12 Y-STR lokusa;
- *PowerPlex® Y23* (Promega) multipleksni Y-STR sustav kreiran za analiziranje 23 Y-STR lokusa;
- *AmpFISTR® Yfiler® PCR Amplification Kit* (Applied Biosystems) namijenjen analizi 17 Y-STR lokusa;
- *Investigator Argus Y-12 QS Kit* (Qiagen) može analizirati 12 Y-STR lokusa.

3. 8. Mitohondrijska DNA i njena primjena u komercijalnim multipleksnim sustavima

Mitohondrijska DNA (mtDNA) je smještena u staničnoj organeli, mitohondriju koji je poznat po svojoj ulozi u procesu oksidativne fosforilacije. Unutar spolnih stanica oocita, moguće je pronaći oko 100 000 kopija mtDNA, a u somatskim stanicama čak od 200-ak do više od 1700 kopija. Upravo u toj činjenici leži razlog uspješne izolacije DNA iz uzoraka koji su se pod djelovanjem vanjskih uvjeta i vremena, ubrzano raspali (1).

Važno je naglasiti da svaki čovjek u svom genomu sadrži istovjetnu kopiju mtDNA, (ukoliko su izostale mutacije) koju je naslijedio od svoje majke, a ona od svoje i tako unazad kroz brojne generacije majčinskom linijom. Mitohondrijski genom je podložan nasumičnim mutacijama, koje se potom prenose na buduće generacije, a samim tim te mutacije koje se detektiraju na mtDNA služe kao obiteljski genetički identitet. To saznanje je pokrenulo napredak u forenzičnim analizama kao i u istraživanjima migracija ljudi kroz prošlost (arheogenetika).

Najvažnija prednost analize mtDNA je u početnoj brojnosti kopija u svakoj stanici koja ima aerobni metabolizam. Također, dijelovi mtDNA koji se analiziraju su dugi svega tristotinjak parova baza čime se postiže veća vjerojatnost da će ciljani dio molekule preživjeti unatoč uvjetima u kojima može biti uzorak. Osim toga, puno veći broj osoba može dati referentni uzorak za analizu s obzirom na način nasljeđivanja. Često se koristi za analize degradiranih uzoraka kostiju ili vlasi kose (9).

Osnovni nedostatak je u tome da je ograničena mogućnost pozitivne identifikacije zbog male snage diskriminacije i analize samo hipervarijabilnih regija. Također, prilikom umnožavanja mtDNA uzoraka PCR metodom ona postaje izrazito osjetljiva na kontaminaciju uzorka. Unatoč tome što je mtDNA analiza skuplja i složenija od analize STR sekvenci u jezgrinoj DNA, stalno se razvijaju nove metode koje usavršavaju ove nedostatke.

Kreirani su različiti komercijalni sustavi za PCR analizu mtDNA, a najviše su u upotrebi oni kojima je moguće sekvencirati HV1 i HV2 (hipervarijabilnu) regiju. Na tržištu se također pojavljuju multipleksni sustavi kojima se može analizirati i nekoliko desetaka SNP lokusa kao i njihovi mikročipovi kojima se sve pojednostavljuje, povećava kvaliteta rezultata te pouzdanost (4).

Osim toga, u slučaju nepodudaranja, određena osoba se može potpuno isključiti tj. mogu se odbaciti sve sumnje. Iako je analiza STR lokusa uspješnija u pozitivnoj identifikaciji zbog većeg broja analiziranih lokusa, varijabilnost na svakom pojedinom lokusu je višestruko manja od varijabilnosti mtDNA.

Prezentaciju rezultata mtDNA analize olakšati može korištenje podataka iz već postojeće EMPOP baze koja je zapravo baza podataka mtDNA haplotipova kontrolnih regija, prikupljenih od različitih svjetskih populacija (1).

3. 9. X-STR markeri i komercijalni multipleksni sustavi

Ljudski spolni kromosomi, X i Y, po svojoj genetičkoj strukturi se bitno razlikuju od autosomalnih kromosoma i samim tim su izuzetno zanimljivi i korisni za specifične slučajeve testiranja srodstva, kao i identifikacijama kada to nije moguće analizom autosomalnim STR markerima ili rezultati nisu dostatni.

Ukoliko su uzorci za analizu ekshumirani skeletni ostatci ili povijesni i prapovijesni uzorci često se podliježe korištenju miniSTR markera ne samo na autosomalnim, nego i na spolnim kromosomima.

X-vezani STR markeri su u forenzici pokazali značajnu ulogu u samostalnoj primjeni, a pogotovo u zajedničkoj sa Y-vezanim STR markerima i autosomalnim markerima.

Jezgra ljudske stanice sadrži 22 para autosomalnih kromosoma i 2 spolna kromosoma. Kod muškaraca su spolni kromosomi u kombinaciji X i Y kromosoma, a kod žena par spolnih kromosoma čine dva X kromosoma. Žene nasljeđuju po jedan X kromosom od oba roditelja, a muškarci samo jedan X kromosom od majke.

Početak primjene X-STR markera veže se za drugu polovicu 20. stoljeća kada su se značajno istraživale X-vezane bolesti poput hemofilije, daltonizma, Duschene mišićne distrofije i drugih sindroma koji se nasljeđuju preko X kromosoma. Oni su kao i autosomalni i Y-STR markeri, visokoinformativni. Genomske baze podataka se sve više razvijaju i već odavno posjeduju više od stotinu sekvenciranih STR polimorfizama pozicioniranih na X kromosomu (10).

Ne tako davno, na tržištu je postojao samo jedan komercijalni sustav, *Mentype Argus X-8 PCR Amplification Kit* (Biotype AG) koji sadrži početnice za 8 X-vezanih STR markera: DXS10135, DXS8378, DXS7132, DXS10074, HPRTB, DXS10101, DXS7423 i DXS10134. Zatim se pojavio i *Qiagen Investigator Argus X-12* sustav koji ima 12 X-vezanih STR lokusa grupirana u četiri povezane skupine (engl. Linkage group) svaka sa po tri markera. Ideja je proizašla kao usavršeni model prethodnog sustava, na način da se svaki set po 3 markera zapravo promatra kao haplotip. Prednosti ovog sustava su u značajno velikoj otpornosti na djelovanje inhibitora, te osjetljivost. Četiri markera su dodatna: DXS10103, DXS10146, DXS10148 i DXS10079 (4).

Jedna od najznačajnijih i najkorisnijih uloga korištenja X-STR markera je u slučajevima utvrđivanja spornog očinstva bez prisustva potencijalnog oca ili u slučajevima utvrđivanja majčinstva (10).

4. DNA FENOTIPIZACIJA

Najnovija istraživanja u polju forenzične genetike baziraju se na SNP genotipizaciji u svrhu ispitivanja pretpostavki određenih fenotipskih karakteristika kao što su boja kože, očiju i kose, osobe čiji se identitet želi ustanoviti.

Ideja i potreba za ovim pravcem razvila se iz slučajeva u kojima je bilo potrebno doći do saznanja o velikom broju fenotipskih karakteristika o osobi od interesa, a da se to nije moglo saznati klasičnim STR profiliranjem. Princip je služio u identifikaciji posmrtnih ostataka, ali i individualizaciji osobe koja je ostavila nekakav biološki trag. Izuzetna korist ove metode je u slučajevima identifikacije nestalih osoba koje su nepoznate, a nemamo nikakvih informacija o njihovim srodnicima koji bi sudjelovali u testiranju. Također, u slučajevima kada počinitelj ostavi nekakav biološki trag, a nemamo izjave svjedoka ili ga nema u bazi podataka, fenotipizacija bi itekako pomogla u forenzičnoj istrazi.

Vrlo je važno napomenuti da se rezultati fenotipskih analiza ne unose u DNA baze podataka nego imaju samo ulogu usmjeravanja istrage na potencijalne i relevantne osobe, a uz pomoć STR profiliranja možemo naposljetku potvrditi njihov identitet.

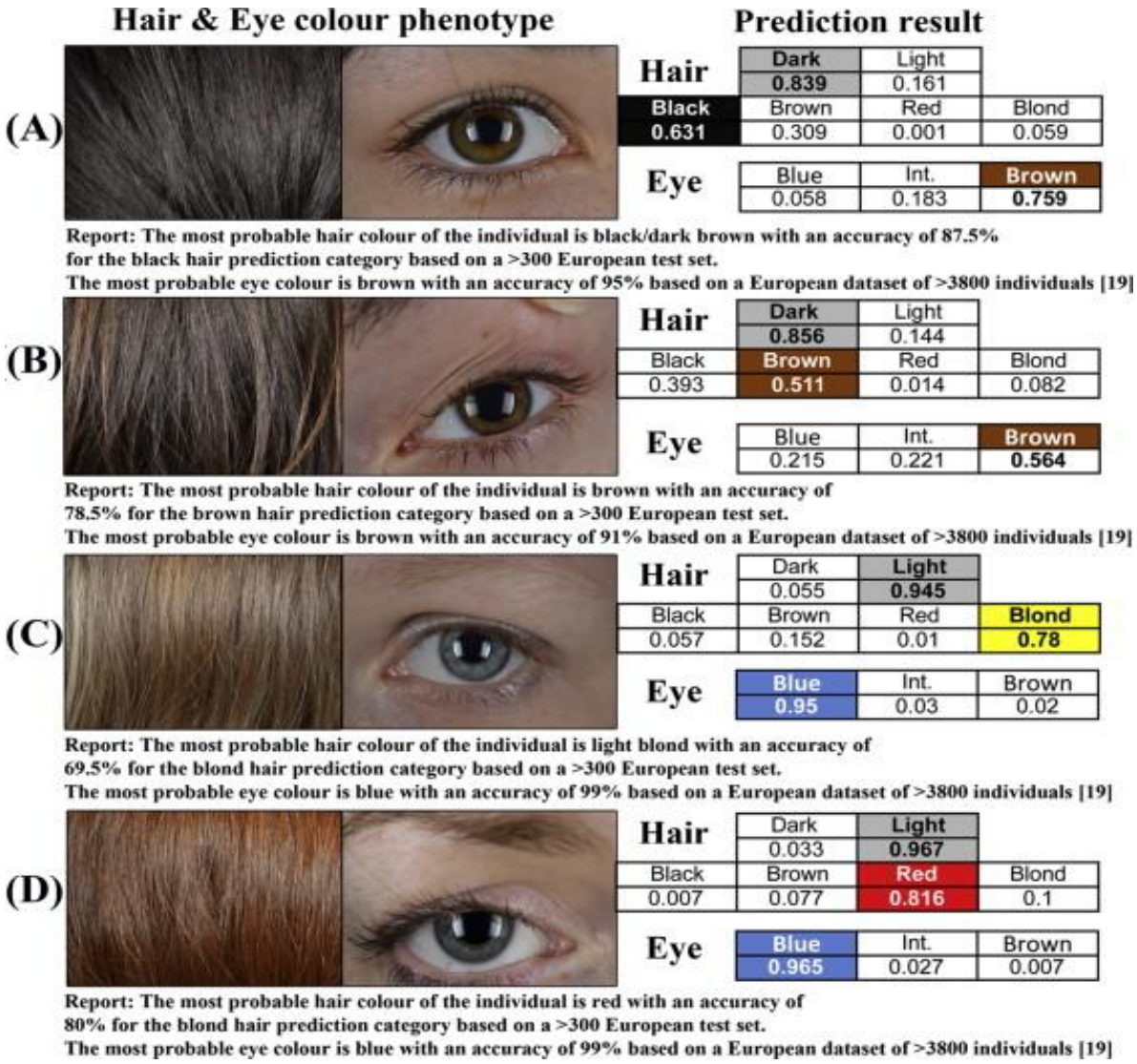
Najnoviji razvojni stadij ove metode bazira se na determinaciji točno preciziranih genetičkih markera koji su u korelaciji sa genetičkom determinacijom karakteristika poput boje očiju, kože i kose. Točnije, usavršavaju se multipleksni sustavi kojima su osnova SNP markeri pozicionirani u blizini onih gena koji su zaslužni za pigmentaciju.

Poznato je šest markera za pretpostavku boje očiju, a sedam za boju kože. SNP multipleksni sustav namijenjen za ovakav tip analize u svrhu pretpostavke boje očiju, zove se *IrisPlex* i sadrži šest najinformativnijih SNP markera iz šest pigmentacijskih gena te bez obzira na biogeografsko podrijetlo ispitanika, daje vrlo pouzdane i objektivne rezultate. Korištenjem evolutivnog genetičkog pristupa, došlo se do saznanja o pet SNP markera koji se sa 82%-om vjerojatnošću, mogu koristiti u pretpostavkama boje kože na razini svjetske populacije (1).

Nedostatak u razvijanju i usavršavanju uvelike predstavlja veliki utjecaj vanjskih faktora na boju kože i kose, subjektivnost prilikom opisivanja boje očiju, ali i to da SNP-ovi imaju različitu informativnost među ljudskih populacijama. Unatoč tome, trenutno se znanstvenici trude napraviti razdiobu na kontinentalne SNP sustave kojima bi se povećala informativnost unutar determiniranih populacija.

Osim pigmentacijskih osobina, u realizaciji i istraživanjima su:determinacija tjelesne visine i individualne starosti.

Studije su pokazale da je najveća preciznost rezultata u zajedničkom korištenju STR lokusa u kombinaciji sa SNP lokusima, nego kada se isključivo koristi jedan tip markera. Najnovija publicirana izdanja, osim ove kombinacije, omogućuju web-statistički alat za računanje pretpostavki podrijetla u slučaju korištenja oba tipa ovih markera (11).



Slika 5. Primjer izračuna HIrisplex sustava za simultanu pretpostavku boje kose i očiju (izvor: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497312001810).

5. DNA BAZE PODATAKA

Prihvaćanjem metoda i rezultata DNA analize kao relevantnog dokaza u istragama i među pravosudnim tijelima, nametnula se potreba kreiranja baza podataka kojima sam proces istrage postaje učinkovitiji i efikasniji, a posebice kada tradicionalnim tehnikama istrage ne možemo identificirati osumnjičenika. Najvažniji faktori koji omogućuju stvaranje kvalitetne DNA baze podataka su zakonodavna vlast odnosno ovlasti ili ograničenja koja zakon nalaže prilikom korištenja baze podataka. Iznimno je važno da je laboratorij kvalitetan i akreditiran za obavljanje DNA analize, sa što kraćim vremenom procesuiranja, ali je isto tako potrebna adekvatna suradnja sa zakonodavstvom u svrhu postizanja efikasnosti ovog sredstva istrage. Mnoge države svijeta su razvile DNA baze podataka sa vlastitim načinima pristupa i pohrane podataka, vremenom čuvanja te brisanjem podataka nakon izvjesnog vremena.

Osim što su se nedužne osobe oslobodile izdržavanja zatvorske kazne i svih optužbi, tako su se mnoga višestruka ubojstva, pljačke, silovanja i sl. delikti povezali sa počiniteljima čiji su biološki uzorci već bili pohranjeni u bazi. Istraživanja su pokazala da više od 60% počinitelja kaznenih djela nasilja nakon izlaska iz zatvora u manje od tri godine počine slično kazneno djelo te ih se uz pomoć baze podataka vrlo brzo identificira (1).

Također, mogu se spriječiti serijska kaznena djela prije samog ponovnog počinjenja upotrebom pravilno sakupljenih i obrađenih bioloških tragova sa mjesta događaja ukoliko u bazi podataka postoji podudaranje (4). Nacionalna baza podataka može funkcionirati na području unutar i izvan granica države čime se njena funkcionalnost i učinkovitost rješavanja zločina povećava, a istovremeno skraćuje vrijeme dugoročnih sudskih procesa (3).

5. 1. Kriteriji za kreiranje baze

Ovisno o državi, različiti su kriteriji kojima se u baze uključuju osumnjičenici, osuđenici ili DNA profili dobiveni iz spornih bioloških tragova. Tendencija je uključivanja zločina poput pljačke do onih teških kaznenih djela i nasilnih delikta. Često uvrštavanje u bazu podataka ovisi i o duljini ili mogućoj duljini kazne, a za uzimanje uzoraka ponekad je potreban i sudski nalog. Većina država nema ograničenja u uključenju DNA profila iz spornih tragova pronađenih na mjestu događaja (1).

5. 2. Uklanjanje profila iz baze podataka

Kao i kod kriterija za uključivanje u bazu podataka, tako i za uklanjanje DNA profila iz baze, ovisi o državi i njihovoj zakonodavnoj vlasti. S obzirom da je mnogo slučajeva zastarjelo te riješeno nakon mnogo godina ili se nikad nisu riješili, neke države zadržavaju podatke o počiniteljima na neodređeno vrijeme ili do njihove smrti. Ukoliko dođe do oslobađajuće presude ili odbacivanja optužbi, često se profili osumnjičenika izbrišu iz baze. U nekim država se profili čuvaju do kraja izdržavanja dodijeljene kazne (12).

U Republici Hrvatskoj zakon nalaže da se ispitivani biološki materijal može koristiti i obrađivati samo tako dugo dok se pridruživanja tragu ili utvrđenje istovjetnosti ili podrijetla ne isključi, a potom se uništava, osim ako nešto drugo nije propisano zakonom. Prema čl. 327.a ZKP-u podatci prikupljeni molekularno-genetskom analizom od okrivljenika koji je kasnije u kaznenom postupku pravomoćno osuđen, pohranjuju se i čuvaju dvadeset godina nakon završetka kaznenog postupka. Iznimno, ako je riječ o kaznenom djelu za koje je propisana kazna zatvora od deset godina ili teža, ili ako je riječ o kaznenom djelu protiv spolne slobode za koje je propisana kazna zatvora teža od pet godina, navedeni podatci se mogu čuvati najdulje četrdeset godina od završetka kaznenog postupka. Po isteku tih rokova, nadležno tijelo će po službenoj dužnosti brisati te podatke. Podatci prikupljeni molekularno-genetskom analizom uzoraka od okrivljenika koji je kasnije u kaznenom postupku pravomoćno oslobođen optužbe, ili je postupak obustavljen ili je optužba odbijena, te podatci prikupljeni molekularno-genetskom analizom uzoraka uzetih od žrtve, čuvaju se deset godina od završetka postupka, a protekom tog roka, nadležno tijelo te podatke po službenoj dužnosti briše. Ako se molekularno-genetskom analizom uzoraka uzetih od drugih osoba, utvrdi da ne pripadaju okrivljeniku, uzorci i podatci će se uništiti odmah po završetku postupka. Uzorci pronađeni na mjestu događaja te drugi uzorci koji nisu pridruženi određenoj osobi, čuvaju se trajno. Podatci prikupljeni molekularno-genetskom analizom, pohranjuju se i čuvaju u bazi podataka u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja ″Ivan Vučetić″ Ministarstva unutarnjih poslova (13).

5. 3. Baze podataka u svijetu i njihov kapacitet

Najveće forenzične baze podataka nalaze se u: Kini (oko 12 milijuna profila), u SAD-u (oko 11 milijuna profila), u Velikoj Britaniji (oko 5,5 milijuna profila) i Francuskoj (oko 1,2 milijuna profila). Osim njih, države koje sadrže preko 100 000 DNA profila u bazama

podataka su: Njemačka, Kanada, Australija, Izrael, Austrija, Novi Zeland, Nizozemska, Švicarska, Španjolska i Finska. Države koje imaju baze podataka, ali nisu među navedenima, sadrže manje od 100 000 DNA profila (1).

5. 4. CODIS baza podataka (SAD)

U Sjedinjenim Američkim Državama, sustav arhiviranja DNA profila je baziran na softverskom kompleksu koji se naziva CODIS (eng. *Combined DNA Indexing System*),a postoji na lokalnom, državnom i nacionalnom nivou. Svi početci se vežu za pilot projekt iz 1990.-e godine i 14 država SAD-a. Nakon četiri godine, usvojio se DNA akt kojim se formalno ovlastio FBI sa ciljem uspostavljanja Nacionalne DNA baze podataka. Upravo ta baza je predstavljena 1998. godine pod nazivom NDIS (eng. *National DNA Indexing System*). CODIS je time unaprijeđen kao distribucijska baza podataka sa tri hijerarhijska nivoa: lokalni, državni i savezni. NDIS je na najvišem nivou CODIS hijerarhije. Drugi nivo je SDIS (eng. *State DNA Index System*) koji je nastao kao inačica LDIS (eng. *Local DNA Index System*) prema nacionalnom nivou. Ovakvim načinom strukturne organizacije se kontroliraju podatci unutar zasebnih laboratorija i oni mogu odlučivati o dijeljenju podataka (4).

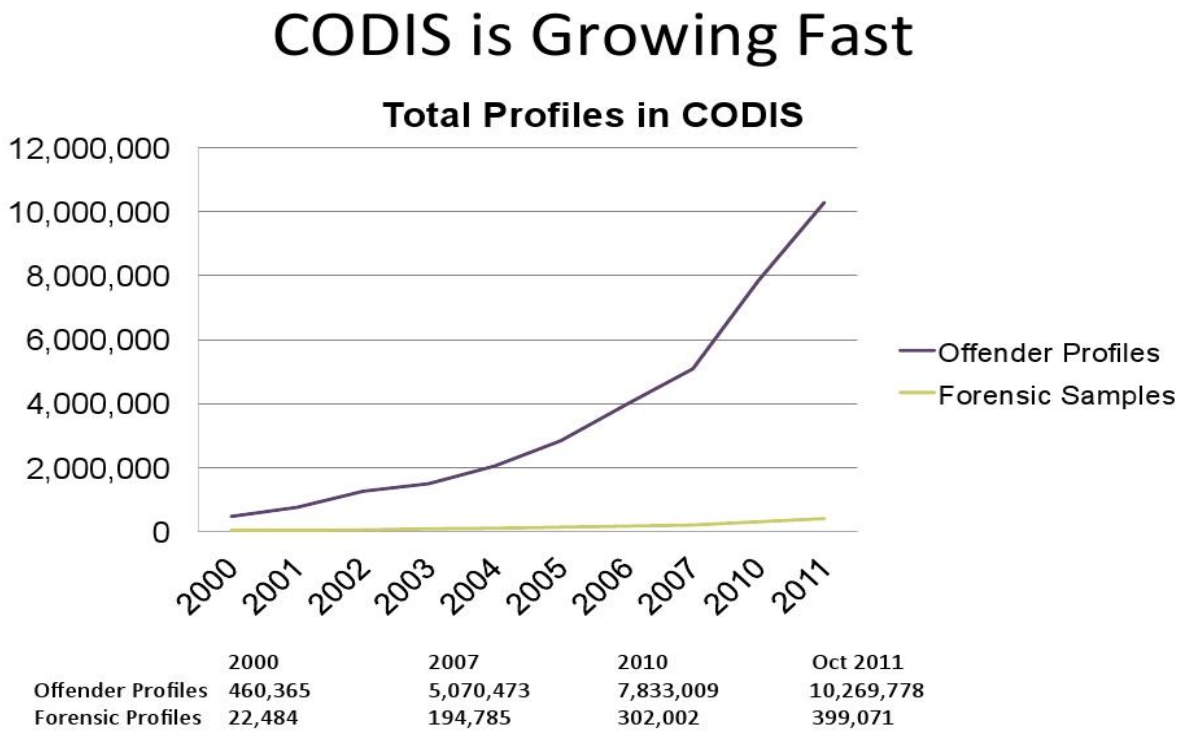
Svih 50 država dio su CODIS programa, a NDIS je pod vlašću FBI-a na tajnoj lokaciji. Osim što forenzični indeks sadrži profile iz bioloških tragova pronađenih na mjestu događaja, prije nekoliko godina dodani su i Indeksi osumnjičenika, nestalih i neidentificiranih osoba i Referentni indeks nestalih osoba. Način na koji CODIS zapravo funkcionira je algoritam za pretraživanje kojim se osim pretraživanja mogu usporediti različiti indeksi koji su pod strogim pravilima u svrhu zaštite privatnosti i podataka osoba (1).

Kod kaznenih djela silovanja i ubojstva, princip kojim se CODIS koristi je usporedba Forenzičnog indeksa sa njim samim, a zatim sa Indeksom osuđenika. Tim usporedbama se mogu povezati dva ili više prethodno nepovezanih slučajeva. S obzirom da CODIS daje jedino potencijalne veze, svaku tu vezu mora potvrditi ili opovrgnuti DNA analitičar.

Status druge po veličini baze podataka, CODIS je zaslužio na temelju svojih brojki koje su u rujnu 2018. godine iznosile: 887 807 forenzičnih profila, 13 528 363 profila optuženika te 3 280 752 profila osumnjičenika. Samim tim je broj pozitivnih identifikacija dosegao 435 887 i time pomogao u 424 268 istraga (14).

Osnova za svaki CODIS-ov profil je sadržaj od osnovnog seta od 13 STR tetranukleotidnih lokusa (D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, vWA, D8S1179, TPOX i FGA). U kombinaciji ovih lokusa vjerojatnost da postoje dvije nesrodne osobe s identičnim DNA profilom iskazuje se u vrijednosti od 10^{-17}(1).

Od 1. siječnja 2017. godine CODIS-ovom setu od trinaest lokusa dodano je još sedam lokusa koji su validirani i službeno u upotrebi, čime se može reći da se u ovom trenutku CODIS sastoji od 20 STR lokusa. Sedam novih lokusa su: D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 i D22S1045 (15).



Slika 6. Grafički prikaz porasta broja DNA profila počinitelja (plava linija) i forenzičnih uzoraka sa mjesta događaja (žuta linija) u CODIS-u tijekom 11 godina (izvor: http://www.skepticaljuror.com/2013/01/codis-interruptus.html).

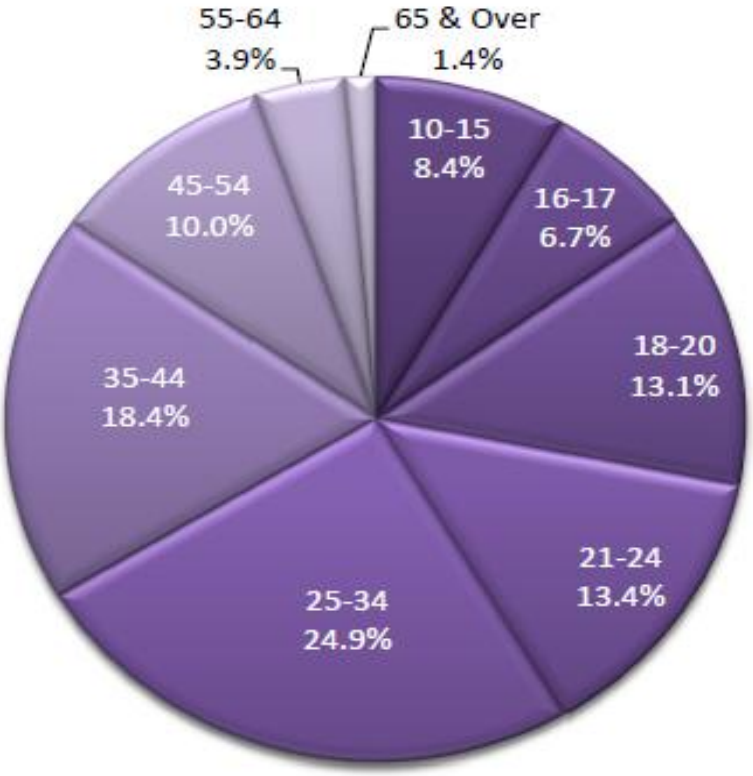
5. 5. Engleska NDNAD baza podataka

Engleska odavno predstavlja državu sa najvećim rezultatima i pristupima u upotrebi forenzične DNA tehnologije na svijetu. Sve je počelo 1995. godine kada je osnovana Nacionalna DNA baza podataka (eng. *National DNA Database*-NDNAD). Engleskoj se tada pridružio i Wales, te su zajedno nastavili razvijati i usavršavati metode načina korištenja DNA dokaza u svrhu identificiranja, zaštite ljudi i izvršavanja kazni kroz proces kriminalističke istrage (4).

Čak 90% svih DNA analiza u sklopu forenzike koje su se provodile u Engleskoj, do nedavno je provodila poludržavna agencija, pod imenom: Služba za forenzičnu znanost (eng. Forensic Science Service-FSS), a osim te dužnosti, imala je ovlast nad DNA bazom podataka za koju je proglasila odgovornom Asocijacija policijskih zapovjednika (eng. *Association of Chief Police Officers*-ACPO). Prije 11 godina je ipak odgovornost za nacionalnu DNA bazu podataka dodijeljena Nacionalnoj policijskoj agenciji (eng. *National Policing Improvement Agency*-NPIA) koja prati funkcionalnost i akreditaciju laboratorija iz kojih se šalju DNA profili u bazu (1).

Prema najnovijim podatcima iz ožujka 2017. godine NDNAD je sadržavao 6 024 032 DNA profila počinitelja i 555 362 profila sa mjesta događaja. Faktori koji se mogu promatrati i pokazuju široku primjenu DNA baza podataka su statistički podatci koju su na dan 31. 3. 2017. pokazali da je najveći broj počinitelja upravo iz Engleske, a zatim Škotske, Walesa pa onda Irske i ostatka Ujedinjenog Kraljevstva. Preko 80% počinitelja su muškarci, a ostatak žene i nepoznati podatci. Također se mogu pratiti i dobne razlike, etnička pripadnost i vrsta počinjenog zločina kao i ostali slični faktori (16).

Uspješnost primjene DNA baze podataka u Velikoj Britaniji, proizašla je iz poprilično liberalnog, ali i pomalo agresivnog zakona u kojem nije predviđeno brisanje podataka i u kojem se dozvoljava pohranjivanje DNA profila svih počinitelja. Europski sud za ljudska prava se suprotstavio ovom zakonu, no to je odbijeno uz obrazloženje o javnom interesu u sklopu prevencije i borbe protiv kriminala (1).



Slika 7. Grafikon prikazuje broj evidentiranih počinitelja u NDNAD bazi podataka prema njihovim dobnim skupinama u ožujku 2017. godine (izvor: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/724596/040718_new_CCS0518718592_National_DNA_Database_Strategy_Board_AR_2016-17_updates_NEW.pdf).

5. 6. DNA baza podataka u Njemačkoj

Status pete po redu po veličini u svijetu, Njemačka DNA baza podataka je opravdala promjenama u zakonodavstvu, sudjelovanjem u prekograničnim slučajevima korištenjem DNA tehnologije te promoviranjem i popularizacijom DNA kao dokaza u forenzici. Parlament i federalno vijeće usvojili su zakon kojim se DNA uzorci mogu uzeti bez obzira o tipu kaznenog djela, bez sudskog naloga i bez obzira o tome je li osoba osumnjičena ili osuđena (1).

Njemačka je također jedna od država koja nakon što se dobije DNA profil pojedinca, uništava biološki uzorak koji sadrži DNA kako bi se osigurala privatnost osobe kojoj uzorak pripada i time spriječile moguće manipulacije (17).

5. 7. INTERPOL baza podataka

INTERPOL-ova DNA baza podataka uspostavljena je 2002. godine pod nazivom *DNA Gateway*. Na samom početku, preporučeno je sedam lokusa u osnovnom setu (ISSOL-*INTERPOL Standard Set of Loci*), a od 2010. je proširen na još 12 na osnovu preporuke ENFSI-a (eng. *European Network of Forensic Science Institutes*). Također, osim ovih 12, set se može proširiti sa jos 16 dodatnih lokusa. Da bi DNA profil bio uvršten u bazu podataka, potrebno je da se analizira na najmanje šest od ponuđenih 12 osnovnih i 16 dodatnih STR lokusa. Baza je organizirana na nekoliko osnovnih kategorija: profili počinitelja, profili sa mjesta događaja, profili nestalih osoba i neidentificiranih tijela. Pretraživanje traje maksimalno 15 minuta (1).

U prosincu 2017. godine INTERPOL DNA baza podataka je sadržavala više od 173 000 DNA profila u više od 84 države članice (18).

Najveća vrijednost ovakve organizacije podataka je razmjena informacija među državama članicama koje time postižu odlične rezultate u borbi protiv kriminala i u iskorištavanju potencijala DNA tehnologije u cilju pronalaska počinitelja na svjetskoj razini. Članice koje unose DNA profile u INTERPOL, također mogu ograničiti pristup podatcima drugim državama.

5. 8. Europski set lokusa (ESS) i razmjena informacija

DNA radna grupa u sklopu ENFSI-a, svake godine izdaje preporuke za primjenu DNA analize među državama Europe. Tako je od 2001. godine, predložen ESS (eng. *European Standard Set*) koji je sadržavao sedam lokusa (TH01, vWa, FGA, D21S11, D3S1358, D8S1179 i D18S51), a također se podudarao sa ISSOL standardom. Kako bi se poboljšali statistički parametri, individualizacija i informativnost, dodano je još pet lokusa: D10S1248, D2S441, D1S1656, D12S391 i D22S1045 (4).

Rastom i usavršavanjem baza podataka, razvila se i prekogranična suradnja europskih država, a time i njihova učinkovitost u razrješenju slučajeva, identifikaciji, borbi protiv terorizma i ostalih oblika kriminalnih radnji. Prvi pozitivni rezultati podudaranja profila zabilježeni su između Austrije i Njemačke, nakon što je u prosincu 2006. godine u Prümu sklopljen sporazum kojim je započelo uspoređivanje sadržaja nacionalnih DNA baza podataka (19).

Kao predstavnik Europske Unije, Njemačka je takav princip sporazuma uvela u EU i u zakone koji vladaju unutar nje, čime su se sve države članice uključile u mrežu nacionalnih baza podataka (1).

5. 9. Baze podataka u Hrvatskoj

U Republici Hrvatskoj se 1996. godine bilježi početak uvođenja metode DNA profiliranja u sklopu rada Centra za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja ″Ivan Vučetić″.

DNA baza podataka koju RH koristi je CODIS, osnovana 2000. godine na principu koji koriste Sjedinjene Američke Države, točnije FBI, i sadrži DNA profile počinitelja kaznenih djela i neidentificiranih tragova. Cilj korištenja ove baze je u provjeri, usporedbi i pohrani DNA profila među ostalim zemljama Europe i svijeta (20).

Osim DNA baze podataka, od 2006. godine postoji i Automatizirani sustav za prepoznavanje otisaka prstiju (*Automated Fingerprint Identification System*-AFIS) koji sadrži dvije manje baze; bazu otisaka prstiju i bazu spornih tragova papilarnih linija.

Prema podatcima iz travnja 2017. godine, u hrvatskim bazama ima oko 35 000 profila i oko 5000 neidentificiranih tragova (19).

Prümskim sporazumom je sklopljen ugovor između Belgije, Njemačke, Španjolske, Francuske, Luksemburga, Nizozemske te Austrije, u cilju jačanja prekogranične suradnje, posebice u borbi protiv terorizma i ostalih oblika kriminalnih radnji te ilegalnih migracija. Odredbe ovoga sporazuma su potom inicijativno predložene Europskoj komisiji koja je taj prijedlog uvažila i sadržaj sporazuma uvrstila u pravni okvir Europske Unije čime su se države članice EU, među kojima je i Hrvatska, obvezale na prekograničnu suradnju pojednostavljenom komunikacijom i razmjenom informacija između tijela zaduženih za provedbu zakonskih mjera u svrhu kriminalističkih istraga i ostalih obavještajnih djelatnosti. Glavne odredbe o suradnji omogućuju državama članicama pristup analiziranim DNA

profilima, sustavima daktiloskopske identifikacije te podatcima o registraciji vozila. U slučaju podudaranja, slijede postupci u kojima se na zahtjev potražuju dodatne osobne informacije od članica koja posjeduju tražene podatke (21).

6. REZULTATI I RASPRAVA

U uvodnom dijelu te u poglavlju materijala i metoda analize DNA, predstavljen je povijesni pregled razvoja DNA metodologije, prihvaćanja ove molekule kao dokaznog materijala te samim tim i kreiranje i usavršavanje sustava za analize kojima se dolazi do krajnjeg rezultata, željenog DNA profila.

Monolokusni sustavi su bili prvi sustavi za analizu čiji je glavni nedostatak bio premala snaga diskriminacije, ali unatoč tome, u to vrijeme početaka i taj jedan lokus je bio poprilično informativan, pogotovo u kombinaciji sa boljim sustavima koji su nudili analizu na šest lokusa.

Nedugo nakon toga, na tržištu su se pojavili brojni multipleksni PCR-bazirani STR sustavi od tri poznata proizvođača u svijetu. Međusobno se razlikuju u sastavu pufera, početnicama i njihovim bojama, internom veličinskom standardu, alelnim ljestvicama, otopini za pripremu uzoraka za elektroforezu te broju lokusa za detekciju što zapravo utječe na snagu diskriminacije, stupanj individualizacije, odnosno informativnost. Njihova najveća kvaliteta i prednost nad ostalim sustavima za analizu su: osnovni sadržaj od poznatih 15 STR lokusa (najčešće CODIS lokusi) i amelogenina koji su kod nekih sustava pojačani visoko informativnim lokusima te puferima sa izuzetnom otpornošću na PCR inhibitore. Njihov nedostatak je lošiji rezultat profiliranja kod uzoraka sa degradiranom DNA gdje se poseže za miniSTR multipleksnim sustavima, ali postoje i sustavi sa mješovitim sastavom STR lokusa u svrhu kvalitetnijih rezultata.

S obzirom na prednost korištenja miniSTR multipleksnih sustava u analizi bioloških uzoraka koji sadrže DNA u malim količinama odnosno, u degradiranim uzorcima, tako se i nedostatak njihovog korištenja javlja u forenzično-statističkoj informativnosti zbog malog broja lokusa koji se mogu simultano koamplificirati.

Y-STR komercijalni multipleksni sustavi funkcioniraju na principu nasljeđivanja Y kromosoma po muškoj liniji, čime je smanjena mogućnost individualizacije, ali se unatoč tome određena osoba ne može isključiti kao donor biološkog traga ukoliko se pokaže podudaranje.

MtDNA s obzirom na svoju brojnost u stanicama, prednjači nad ostalim sustavima za analizu, pogotovo uzoraka koji su ubrzano propali zbog vanjskih uvjeta i starosti. Također, dijelovi koji se analiziraju sadrže manji broj baznih parova nego ostali sustavi čime su veće šanse da

će se dobiti rezultati, tj. DNA profil. Zbog načina nasljeđivanja majčinskom linijom, više osoba može biti uključeno u analizu. Nedostatci su međutim, smanjena mogućnost pozitivne identifikacije zbog analize samo hipervarijabilnih regija te smanjene snage diskriminacije, osjetljivost na kontaminaciju te složenost i visoka cijena analize u odnosu na analizu STR lokusa iz jezgrine DNA. Unatoč ovim nedostatcima, u slučaju nepodudaranja, osoba se može potpuno isključiti, a i varijabilnost mtDNA je višestruko veća nego na svakom pojedinom lokusu u analizi STR lokusa.

Kao i kod Y-STR vezanih lokusa, X-STR vezani lokusi su uvelike informativni, a nude mogućnost korištenja miniSTR oblika ukoliko se radi o skeletnim ostacima, iz dalje povijesti i prapovijesti. Jedna od prednosti, kao i kod Y-STR lokusa, je korištenje u svrhu genealogije. Stoga je njihova najveća primjena upravo u kombinaciji sa ostalim multipleksnim sustavima. Druge prednosti su osjetljivost i otpornost na utjecaj inhibitora, kao i korištenje u dokazivanju majčinstva i očinstva bez prisustva potencijalnog oca.

SNP markeri su pokazali svoj značaj u razvijanju metoda fenotipizacije, poput pretpostavki boje očiju, kose i kože. Iako se ti podatci ne unose u baze podataka, mogu uvelike olakšati smjer istrage kada nemamo drugih opcija. Nedostatci su u subjektivnom opisivanju karakteristika, utjecaju vanjskih uvjeta, ali i različita informativnost SNP markera među svjetskim populacijama.

Razvijanjem metoda za analizu DNA profila, javila se potreba za DNA bazama podataka. Bez obzira na zakonodavstvo u određenim državama, sve DNA baze podataka imaju istu svrhu, odnosno prednosti u lakšem pretraživanju i pohrani profila dobivenih od različitih počinitelja, neidentificiranih profila i nestalih osoba te profila koji su dobiveni iz bioloških tragova sa mjesta događaja. Osim toga, u prevenciji kriminaliteta se koriste različiti statistički podatci (dob, spol, nacionalnost, vrsta zločina) koji se dobiju na godišnjim izračunima upravo prema profilima sadržanima u bazi, a koji su ostvarili podudaranje. Nedostatci su uvjeti zadržavanja pohranjenih profila, tj. njihovo trajno bilježenje u bazi te kršenje etičkih i socijalnih ljudskih prava zbog mogućih manipulacija profilima.

Standardizacijom i kreiranjem DNA baza podataka u svijetu, nastao je set lokusa koji koristi CODIS te postao jedan od osnovnih dijelova svih poznatih multipleksnih sustava za DNA profiliranje. Korporacije koje proizvode komercijalne sustave za DNA analize svakim danom na tržište plasiraju nova dostignuća i napredna izdanja svojih proizvoda u cilju razvoja forenzične genetike.

7. ZAKLJUČCI

Odabir određenog komercijalnog multipleksnog STR sustava za DNA profiliranje ovisi o više faktora, a najviše o kvaliteti uzorka kao i okolnostima u svrhu kojih se profiliranje vrši.

Najveću upotrebu imaju autosomalni multipleksni STR sustavi triju najvećih proizvođača (*Promega, Applied Biosystems, Qiagen*) koji omogućuju koamplifikaciju na velikom broju lokusa,a samim tim veću snagu diskriminacije i individualizacije.

U slučajevima degradirane DNA u uzorku ili uzoraka koji su propali zbog utjecaja vanjskih faktora, najbolji odabir su miniSTR sustavi ili mtDNA.

U svrhu genealogije i dokazivanja očinstva ili majčinstva mogu se koristiti X-vezani ili Y-vezani STR markeri. Majčinstvo se također može dokazati korištenjem mtDNA.

DNA baze podataka omogućuju brz, efikasan i praktičan oblik pretraživanja i pohranjivanja DNA profila u svrhu identifikacije počinitelja zločina, nestalih i neidentificiranih osoba kao i prevencije svih oblika kriminala. Sadržani DNA profili su izrađeni prema preciznim uputama o analizi na određenim lokusima koji su odabrani u pojedinim multipleksnim sustavima.

Prümskim sporazumom, odnosno ulaskom Hrvatske u Europsku Uniju, postignut je zajednički cilj država članica o jačanju prekogranične suradnje, posebice u borbi protiv terorizma i ostalih oblika kriminalnih radnji te ilegalnih migracija. Usvajanjem odredbi sporazuma postiže se kvalitetna prekogranična komunikacija i razmjena informacija koje su ključne za uspješne rezultate istraga i ostalih obavještajnih djelatnosti.

8. LITERATURA

1. Marjanović D, Primorac D. Forenzična genetika: teorija i aplikacija. Sarajevo: Naučna i stručna knjiga ″Lelo″; 2013.

2. Butler JM. Fundamentals of Forensic DNA Typing.Elsevier Acaademic Press. National Institute of Standards and Technology; 2010.

3. Panneerchelvam S, Norazmi MN. Forensic DNA Profiling and Database. Malays J Med Sci. 2003 Jul;10(2):20-26.

4. Butler JM. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. Elsevier Academic Press. National Institute od Standards and Technology; 2011.

5. Levitt M. Forensic databases: benefits and ethical and social costs. British Medical Bulletin. 2007 Sep 1;83(1):235-248.

6. Yanfang L, Ying L, Juanjuan G, Xiaoliang F, Zhihui W, Yujie L, et al. Genetic polymorphism of 29 STR loci in the Hunan Han population from China. Forensic Sciences Research. 2017.

7. Roewer L. DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. Investigative Genetics. 2013.

8. Harder M, Renneberg R, Meyer P, Krause-Kyora B, Wurmb-Schwark N. STR-typing of ancient skeletal remains: which multiplex-PCR kit is the best?. Croat Med J. 2012 Oct;53(5):416-422.

9. Gill P. Role of short tandem repeat DNA in forensic casework in the UK-past, present, and future perspectives. Biotechniques. 2002 Feb;32(2):366-8.

10. Szibor R. X-chromosomal markers: Past, present and future. Forensic Science International: Genetics 1. 2007. 93-99.

11. Butler-Gettings K. Forensic Ancestry and Phenotype SNP Analysis and Integration with Established Forensic Markers. Disertacija. U. S. Department of Justice; 2013.

12. Santos F, Machado H, Silva S. Forensic DNA databases in European countries: is size linked to performance?. Life Sci Soc Policy. 2013 Dec;9:12.

13. Primorac D. Kazneno procesno pravo II: IV. izmijenjeno, dopunjeno i prošireno izdanje. Split: Sveučilišni odjel za forenzične znanosti. Sveučilište u Splitu; 2015.

14. CODIS-NDIS Statistics. U.S. government. U.S. Department of Justice. Pristupljeno: 23.10.2018. Dostupno na: https://www.fbi.gov/services/laboratory/biometric-analysis/codis/ndis-statistics

15. Combined DNA Indexing System (CODIS). U.S. government. U.S. Department of Justice. Pristupljeno: 23.10.2018. Dostupno na: https://www.fbi.gov/services/laboratory/biometric-analysis/codis

16. National DNA Database Strategy Board Annual Report 2016/2017. National Police Chief's Council. Home office. Pristupljeno: 23.10.2018. Dostupno na: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/724596/040718_new_CCS0518718592_National_DNA_Database_Strategy_Board_AR_2016-17_updates_NEW.pdf

17. DNA Databases and Human Rights. Forensic Genetics Policy Initiative. Pristupljeno: 23.10.2018. Dostupno na: http://dnapolicyinitiative.org/resources/dna-databases-and-human-rights/

18. Interpol's DNA database. INTERPOL EXPERTISE. INTERPOL. Pristupljeno 23.10.2018. Dostupno na: https://www.interpol.int/INTERPOL-expertise/Forensics/DNA

19. Derenčinović D, Roksandić Vidlička S, Dragičević Prtenjača M. ″Projekti nedužnosti″ i naknada DNK vještačenja u Republici Hrvatskoj-moguća stvarnost ili nedostižna želja. Zbornik PFZ. 2017. 67. (3-4) 373-404.

20. Forenzična biologija. Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić. Ministarstvo unutarnjih poslova Republike Hrvatske. Pristupljeno: 23.10.2018. Dostupno na: http://www.forenzika.hr/74016.aspx

21. Acts adopted under title VI of the EU Treaty. Council Decision 2008/615/JHA of 23 June 2008 on the stepping up of cross-border cooperation, particulary in combating terrorism and cross-border crime. Official Journal of the European Union. 2008 Aug 6. L 210/1-11.

9. SAŽETCI

DNA PROFILIRANJE I BAZE PODATAKA

U uvodnom dijelu ovoga rada, predstavljen je povijesni pregled razvoja DNA metodologije, tehnologije i njenog prihvaćanja kao relevantnog dokaza u kriminalističkim istragama i među pravosudnim tijelima.

Cilj ovoga rada je prikazati metode i načine analize DNA u forenzici te opisati i usporediti multipleksne sustave za analizu genetičkih lokusa. Također će se objasniti njihove prednosti i nedostatci te dati preporuka o korištenju. Na kraju rada se donosi pregled najpoznatijih DNA baza podataka u svijetu i obrazloženje njihove povezanosti sa multipleksnim sustavima za analizu s ciljem naglašavanja važnosti DNA baza podataka i razmjene među njima.

Otkriće svojstva polimorfizma koje opisuje eukariotski genom, potaknulo je razvoj DNA profiliranja koje se zasniva na principu korištenja određenih molekularnih markera, uglavnom STR, ali to mogu biti i VNTR i SNP markeri. Konačan rezultat DNA profiliranja prikazuje se elektroferogramom, odnosno setom markera (lokusa) odabranog komercijalnog kompleta multipleksnog sustava, sa pripadajućim pikovima koji predstavljaju alelne varijante.

Opisane su metode rada osnovnih multipleksnih sustava za analizu DNA, najviše autosomalnih STR sustava triju korporacija (*Promega*, *Applied Biosystems*, *Qiagen*), kao i spolnih STR markera (X i Y multipleksni sustavi), mtDNA te miniSTR sustava.

Rezultati su pokazali da odabir određenog komercijalnog multipleksnog STR sustava za DNA profiliranje ovisi najviše o kvaliteti uzorka kao i okolnostima u svrhu kojih se profiliranje vrši. Najviše se koriste autosomalni multipleksni STR sustavi zbog mogućnosti koamplifikacije na velikom broju lokusa te zbog značajne visoke snage diskriminacije i individualizacije. U slučajevima degradirane DNA u uzorku ili uzoraka koji su propali zbog utjecaja vanjskih faktora, najbolji odabir su miniSTR sustavi ili mtDNA. U svrhu genealogije i dokazivanja očinstva ili majčinstva mogu se koristiti X-vezani ili Y-vezani STR markeri te mtDNA. DNA baze podataka omogućuju pretraživanja i pohranjivanja DNA profila u svrhu identifikacije počinitelja zločina, nestalih i neidentificiranih osoba kao i prevencije svih oblika kriminala.

Sadržani DNA profili su izrađeni prema preciznim uputama o analizi na određenim lokusima koji su odabrani u pojedinim multipleksnim sustavima.

Ključne riječi: DNA profiliranje, multipleksni sustavi, molekularni markeri, DNA baza podataka

DNA PROFILING AND DATABASES

In the introductory part of this thesis, a historical review of DNA methodology, technology and its acceptance as a relevant evidence in criminal investigations and judicial authorities has been presented.

The aim of this thesis is to demonstrate methods of DNA analysis in forensics and to describe and compare multiplex systems for genetic loci analysis. In thesis we will also show advantages and disadvantages and make usage recommendations for particular system. In the end of the thesis is an overview of the most renowned DNA databases in the world and the explanation of their association with multiplex systems for analysis with goal to emphasize their importance and importance of data exchange among them.

The discovery of the polymorphisms described by the eukaryotic genome has prompted the development of DNA profiling based on the use of certain molecular markers, mostly STR, but also by VNTR and SNP markers. The ultimate DNA profiling result is shown by the electropherogram, set of markers (loci) of the selected commercial set of the multiplex system, with the associated peaks representing alleles.

The methods of basic multiplex DNA analysis systems, the most autosomal STR systems of three corporations (*Promega*, *Applied Biosystems*, *Qiagen*), as well as sex STR markers (X and Y multiplex systems), mtDNA and miniSTR systems are described.

The results have shown that selecting a particular commercial multiplex STR system for DNA profiling depends most on the sample quality as well as the circumstances for which profiling is performed. Most autosomal multiplex STRs are used due to the possibility of co-amplification on a large number of loci and due to the significant high levels of discrimination and individualization. In cases of degraded DNA in a sample or samples that have failed due to the influence of external factors, the best choice is miniSTR systems or mtDNA. X-linked or Y-bound STR markers and mtDNA may be used for the purposes of genealogy and paternity or motherhood demonstration. DNA databases allow searching and storing of DNA profiles for the purpose of identifying perpetrators, missing and unidentified persons as well as the prevention of all forms of crime. Contained DNA profiles were made according to precise analysis instructions on certain loci that were selected in multiple multiplex systems.

Key words: DNA profiling, multiplex systems, molecular markers, DNA database

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNE INFORMACIJE Petra Popović

Mostarska 6/3, 20 350 Metković, Hrvatska

020 686/570 099 572 1139

petra.popovic@hotmail.com

Spol Ž | Datum rođenja 15/01/1995 | Državljanstvo Hrvatsko

ZVANJE Sveučilišna prvostupnica biologije i ekologije mora;

RADNO ISKUSTVO

Volontiranje u udruzi ″Otac Ante Gabrić″ u Metkoviću i u Prirodoslovnom muzeju u Metkoviću

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2016-danas	Studentica sveučilišnog odjela za forenzične znanosti, smjer: Forenzična kemija i molekularna biologija (Split, Hrvatska)
2013-2016	Sveučilišni odjel za studije mora, smjer: Biologija i ekologija mora (Split, Hrvatska); sveučilišna prvostupnica biologije i ekologije mora
2009-2013	Opća gimnazija Metković (Metković, Hrvatska)
2001-2009	Osnovna škola Stjepana Radića (Metković, Hrvatska)

OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik: Hrvatski jezik

Ostali jezici: Engleski jezik

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Njemački	A2	A2	A2	A2	A2
	Certifikat Goethe instituta				

Komunikacijske vještine
- dobre komunikacijske vještine stečene tijekom rada na poslovima student servisa: anketiranje, promocije
- komunikacijske vještine u radu sa djecom

Organizacijske / rukovoditeljske vještine
- organizacija ljetnih radionica za djecu u Prirodoslovnom muzeju u Metkoviću
- rukovoditeljske vještine u organizaciji smotre folklora ″Na Neretvu misečina pala″

Poslovne vještine
- dobro vladanje u postupcima vođenja i usluživanja ugostiteljskog objekta tijekom sezonskog rada
- timski duh
- fleksibilnost

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik

- dobro upravljanje uredskim protokolom (pisanje i uređivanje teksta, tablica, prezentacija)

Ostale vještine	▪ ples (folklor) ▪ scuba ronjenje
Vozačka dozvola	B kategorija

DODATNE INFORMACIJE

Prezentacije	Znanstvena radionica ″Šetnja mikrosvijetom″i ″Ljetna škola biologije mora″ u Prirodoslovnom muzeju u Metkoviću
Projekti	″Prepoznaj i spasi me″, 2017.
Konferencije	ISABS 2017. i SHC 2018.
Priznanja i nagrade	Županijsko natjecanje iz biologije (Dubrovnik, 2012.)
Članstva	″KUD Metković″ Metković i Ronilačko ekološki klub ″Hvidra″ Split
Tečajevi	OWD (Open Water Diver)-prva ronilačka kategorija 2016.
Certifikati	Goethe Institut-njemački jezik

(PRILOG 3)

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Sveučilišni odjel za forenzične znanosti

Izjava o akademskoj čestitosti

Ja, Petra Popović, izjavljujem da je moj diplomski rad pod naslovom ″DNA PROFILIRANJE I BAZE PODATAKA″ rezultat mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Nijedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan bez citiranja i ne krši ičija autorska prava.

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

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

Split, 05. prosinca 2018.

Potpis studenta/studentice: Petra Popović