Identifikacija polimorfizama kontrolne regije mitohondrijske DNA u populaciji Bosne i Hercegovine i razvoj protokola za njihovu forenzičku primjenu

Konjhodžić, Rijad

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:047534

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI



Središnja medicinska knjižnica

Konjhodžić, Rijad (2014) ***Identifikacija polimorfizama kontrolne regije mitohondrijske DNA u populaciji Bosne i Hercegovine i razvoj protokola za njihovu forenzičku primjenu [Identification of the mitochondrial DNA control region polymorphisms in population of Bosnia and Hercegovina and the development of the protocol for their forensic application].*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/2107

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Rijad Konjhodžić

Identifikacija polimorfizama kontrolne regije mitohondrijske DNA u populaciji Bosne i Hercegovine i razvoj protokola za njihovu forenzičku primjenu

DISERTACIJA

Zagreb, 2014.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Rijad Konjhodžić

Identifikacija polimorfizama kontrolne regije mitohondrijske DNA u populaciji Bosne i Hercegovine i razvoj protokola za njihovu forenzičku primjenu

DISERTACIJA

Zagreb, 2014.

Disertacija je izrađena u OJ Klinička patologija, KCU Sarajevo

Voditelj rada: prof. dr. sc. Milovan Kubat

Disertaciju posvećujem mojoj majci Hajriji. Kažu da čovjeku majka treba sve manje s vremenom, moje iskustvo je obratno.

Posebnu zahvalu dugujem svom mentoru i prijatelju Prof. Milovanu Kubatu, vjerovatno najzaslužnijem covjeku za moj razvoj u forenzičkoj genetici

Takodjer, želim zahvaliti i:

Mojoj sestri Almi, za konstruktivne metodološke savjete i zaštitu od već spomenute majke

Prof. Dr Lucijanu Negovetiću. Obrana doktorske disertacije se smatra završetkom nečijeg formalnog obrazovanja, bez njega, moje ne bi stiglo ni na pola puta.

Aniti Putrić za pomoc i razumjevanje tijekom studija

Mom timu i kolegama na Kliničkoj patologiji KCU Sarajevo, posebno Adisu, za podršku, i razumjevanje tijekom stalnog izbivanja proteklih godina

Mom rahmetli ocu, čije riječi često prepoznam u rečenicama koje napišem

Mojim prijateljima, koje s razlogom zovem braćom, jer mi toliko znače i upravo se tako ponašaju prema meni

Mom prijatelju i kolegi Jonu Davorenu za konsultacije i pristup biblioteci u BODE-u

Gistonu, Gizmi i Fošanu, vjerovatno jedina tri živa bića u mojoj blizini koja me nikad u proteklih 6 godina nisu pitali kad ću doktorirati

Sadržaj

Popis oznaka i kratica

1. Uvod 1
   - 1.1 Definicija problema 1
   - 1.2 Postavljanje problema 2
   - 1.3 Opći osvrt: Mitohondrija - građa i uloga 5
     - 1.3.1. Humani mitohondrijski genom 6
     - 1.3.2 Heteroplazmiji mtDNA 9
     - 1.3.3 Kontrolna regija (*D-loop),* hipervarijabilne regije i njihova forenzička primjena 11
     - 1.3.4 Nuklearni pseudogeni 12
     - 1.3.5 Forenzička primjena analize mtDNA 12
     - 1.3.6 Statistička analiza u primjeni forenzičke DNA analize mtDNA 15
   - 1.4 Pregled dosadašnjih istraživanja relevantnih za identifikaciju i detekciju žarišta SNP-ova 16
2. Hipoteza 21
3. Ciljevi istraživanja 22
4. Materijali i metode 23
   - 4.1 Zadaci 23
   - 4.2 Uzorak 23
   - 4.3 Izolacija DNA 25
   - 4.4 Amplifikacija DNA 27
   - 4.5 Detekcija amplifikata na elektroforeznom gelu 29
   - 4.6 Sekvenciranje PCR produkata 30
   - 4.7 Kreiranje početnica za jednobaznu ekstenziju 32

5. Rezultati 41
5.1 Populacijski rezultat i detekcija SNP žarišta 41
5.2 Rezultati analize jednobaznom ekstenzijom 55
6. Rasprava 63
7. Zaključci 72
8. Sažetak 74
9. Sažetak na engleskom jeziku 76
10. Literatura 78
11. Biografija 89

Popis oznaka i kratica

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

bp – bazni par(ovi)

mtDNA – mitohondrijska DNA

PCR – lančana reakcija polimeraze

RT-PCR – lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

rpm – broj okretaja u minuti

HV – hipervarijabilne regije mitohondrijske DNA

STR – kratka tandemska ponavljanja

SNP – jedinični nukleotidni polimorfizmi

CRS – referentna Cambridge sekvenca

dNTP – deoksinukleotidtrifosfat

ddNTP - dideoksinukleotidtrifosfat

1. UVOD

1.1 Definicija problema

Analiza mitohondrijske DNA, posebno njene hipervarijabilne regije, je općeprihvaćena metoda u forenzičkoj genetici. To je u suštini komparativna analiza, kojoj je svrha obraditi i adekvatno profilirati genetski materijal s mjesta zločina i referentnih uzoraka, međusobno ih usporediti, i, na kraju, prezentirati rezultate na način prihvatljiv i koristan u sudskom procesu.

Svako forenzičko vještačenje, pa tako i analiza mtDNA, se sastoji od prikupljana uzoraka, laboratorijske obrade, i prezentacije rezultata. Prikupljanje uzoraka je visoko standardiziran proces kojim se bave profesionalci koji imaju pristup mjestu zločina. Za veliku većinu vještaka DNA analize posao počinje kad uzorci stignu u laboratorij. Od vještaka se očekuje da znanstvenim metodama dobije rezultat čiju će važnost prezentirati na sudu.

Standardna metoda dobivanja rezultata kada je u pitanju manipulacija mtDNA u forenzici je sekvenciranje hipervarijabilnih regija HV1 i HV2 metodom po Sangeru. Kombinacijama prednjih i zadnjih početnica dobivamo potpune sekvence regija HV1 i HV2, koje uspoređujemo s referentnom sekvencom za mitohondrijsku DNA. Iznošenje rezultata je dvodimenzionalno: prezentira se odnos između dobivenih sekvenci u konkretnom slučaju, kao i njihov odnos prema referentnoj sekvenci.

Dobivanje spomenutih potpunih sekvenci regija HV1 i HV2 je laboratorijski proces koji uključuje ekstrakciju DNA, PCR amplifikacije HV regije, elongacije lanaca pojedinačno s prednjim i zadnjim početnicama, i na kraju sekvenciranje dobivenih lanaca.**(1)** To je poprilično dug i zahtjevan proces, koji, u normalnim radnim uvjetima, uzima dva do tri radna dana. I sam proces analiziranja i usporedbe cijelih dobivenih sekvenci je dug, bez obzira na dostupnost različitih računalnih programa kreiranih za tu svrhu. Primjera radi, HV1 regija je veličine 342 bp, na kojoj imamo identificirana žarišta 15 SNP-ova.**(2)**

Razvijanje metoda koja omogućuju tipizaciju SNP-ova bez potpunog sekvenciranja hipervarijabilne regije, a koje su jednostavnije i/ili vremenski kraće su česta meta istraživanja, i u praksi postoji nekoliko publiciranih alternativnih protokola.**(3,4,5,6)**

Sangerova metoda sekvenciranja je donijela revoluciju u manipulaciji genetskog materijala, ali, s forenzičkoga stajališta, njezina ograničenja u detekciji miješanih uzoraka predstavljaju problem.**(4)** Detekcija utemeljena na fragmentarnoj analizi jednobaznih ekstenzija bi u mnogome unaprijedila učinkovitost forenzičke mtDNA analize iz aspekta testiranja miješanih uzoraka.

Utvrđivanje populacijskih podataka je od iznimnog značaja za potpuno uvođenje metode u sudsko-forenzičnu praksu. Obrađeni broj uzoraka koje čine populacijsku studiju najprije mora biti dovoljno velik, a onda se moraju uzeti u obzir i demografske odlike populacije koju ona predstavlja.**(7)**

Determiniranje SNP-ova sa statističkim potencijalom unutar populacije, kao i kreiranje alternativnog protokola klasičnom Sangerovom sekvenciranju, koji će fragmentarnom analizom testirati SNP-ove koji su utvrđeni populacijskom studijom kao forenzički signifikantni, daje novu dimenziju forenzičkom tipiziranju mtDNA, kao i njenoj primjeni u sudskoj praksi.

1.2 Postavljanje problema

Varijabilnost genoma mtDNA između različitih individua gotovo u cijelosti leži u razlikama u jednom baznom paru na utvrđenim mjestima, premda postoji i manji broj insercija i delecija koje mogu imati forenzičku signifikantnost.**(8)** Publiciranjem Revidirane Cambridge sekvence humanog mitohondrijskoga genoma, utvrđena je i praksa iznošenja rezultata analize u vidu odstupanja testirane od referentne sekvence. (**9,10**)

Danas se većina forenzičkog DNA testiranja provodi putem analize kratkih ponavljajućih sljedova (STR) na nuklearnoj DNA. Razlozi za to leže u većoj specifičnosti STR markera, ali i u jednostavnosti STR analize.**(4)** Ipak, dijelom zbog njene cirkularne forme, broja kopija, i veće stabilnosti, degradacija mtDNA je sporiji

proces, tako da vrlo često uspijevamo dobiti čitljive sekvence hipervarijabilnih regija tamo gdje smo bili neuspješni sa STR analizom.**(11)** Također, ekskluzivno nasljeđivanje mtDNA po majci može se pretvoriti u prednost kod forenzičkog vještačenja, u slučajevima kada nam najbliži srodnici nisu na raspolaganju za uzimanje uzoraka. To čini mtDNA analizu još uvijek nezamjenjivim forenzičkim oruđem.

Cilj sudskog DNA vještačenja je dobiti zaključak o podudaranju dva ili više uzoraka, potkrijepljen numeričkom vrijednošću izraženom u postotcima, kao i u prevalenciji dobivenog profila unutar testirane populacije, odnosno mogućnošću poklapanja sekvenci koje potiču od dvije različite individue čistom slučajnošću.**(12)** Preduvjet za to je postojanje populacijske studije za populaciju unutar koje se vrši vještačenje, odnosno, u konkretnom slučaju mtDNA analize, utvrđivanje koji se to SNP-ovi javljaju dovoljno često da bi se mogli iskoristiti u praksi forenzičkog vještačenja. **(13)** Potreba za takvom studijom je višestruka, jednako iz aspekta populacijske, kao i primijenjene forenzičke genetike. Usporedba dobivene populacijske studije s već postojećim referentnim studijama nudi neophodan uvid u populacijske razlike, i time, osim što čini buduću statističku analizu znatno preciznijom, predstavlja i osnovnu polaznu točku za daljnja istraživanja. Bez validne populacijske studije, dobiveno podudaranje svih vrsta DNA profila između referentnih i spornih uzoraka, pa tako i profila mtDNA, predstavlja samo indiciju.**(14)**

MtDNA analiza obično uključuje tipiziranje uzoraka gdje je početna količina genetskoga materijala izuzetno mala (zubi, dlake, kratke kosti). Uz svakodnevnu forenzičku praksu, svoju najširu primjenu doživjela je ona u identifikaciji nestalih osoba nakon oružanih konflikta i masovnih tragedija. **(4)**

Iznošenje rezultata forenzičke analize mtDNA vrši se u minimalnom tekstualnom obliku, i to kao razlike obrađene sekvence sa rCRS. Primijećene razlike između dušičnih baza navode se iza numeričke pozicije nukleotida (16093 C). Ovim formatom se podrazumijeva da su svi ostali nukleotidi u obrađenoj sekvenci identični cRS-u. Insercije se bilježe koristeći redni broj prethodnoga nukleotida s točkom i brojem ‘1’ za prvu inserciju, ‘2’ ukoliko postoji druga, i tako dalje . Delecije

se bilježe sa srednjom crtom '-', ili oznakama 'D','d' ili 'del' iza pozicije nukleotida gdje je delecija primijećena (nrp. '309-', '309D', '309d').**(4,13,15)**

Iako su varijacije moguće u sekvenci čitave kontrolne regije, ipak se ističu SNP-ovi koji se pojavljuju na određenim mjestima, takozvana žarišta (*SNP Hotspots).* To su hipervarijabilni lokusi u genomu, na kojima je grupirana većina primijećenih varijacija. Ukoliko utvrđena učestalost manje zastupljene alele na jednom od primijećenih žarišta prelazi 10%, možemo reći da je taj SNP forenzički signifikantan.**(4)** Grupiranjem svih takvih SNP-ova na nekoj sekvenci humane DNA, u ovom slučaju hipervarijabilne regije mtDNA, prevalencama njihovih više i manje zastupljenih dušičnih baza, zajedno s ostalom pripadajućom statistikom, dobivamo populacijsku studiju koja nas interesira, i koju možemo koristiti u statističkoj analizi neophodnoj za vještačenja. Taj proces je već ustaljen kod STR analize, s time da je broj mogućih alela kod STR-ova koji se koriste u forenzici gotovo uvijek veći od dva, što je i jedna od tajni njihove veće specifičnosti. (**16**).

Sangerova metoda predstavlja metodu sekvenciranja jednolančane DNA, koja je razvijena prije nekih 30 godina. Iako se u posljednje vrijeme Sangerovo sekvenciranje sve više zamjenjuje metodama sekvenciranja nove generacije *(next-gen sequencing),* ono i nadalje ostaje u širokoj uporabi, te za projekte poput analize hipervarijabilne regije predstavlja metodu izbora. Sekvenciranje se vrši selektivnom inkorporacijom dideoksinukleotida od strane DNA polimeraze za vrijeme *in vitro* DNA amplifikacije.**(17)** Dideoksinukleotidi, koji se u amplifikacionu otopinu dodaju zajedno sa normalnim deoksinukleozidtrifosfatima (dNTPs), ne dozvoljavaju daljnju elongaciju lanca zbog nedostatka –OH grupe na 3' ugljiku. Također, terminirajući dideoksinukleotidi su označeni bojom, tako da terminirani fragmenti fluoresciraju kada dođu pod lasersku zraku. **(18)** Analizirajući dovoljan broj hipervarijabilnih sekvenci iz uzoraka uzetih od nesrodnih pojedinaca utvrđujemo SNP-ove od interesa, njihovu lokaciju na genomu, kao i njihove varijante.

Potpuno sekvenciranje regije genoma je najpotpuniji i najtemeljitiji način analize. **(19)** Ipak, budući da se SNP-ovi koji su karakterizirani unutar populacijske studije kao glavni nosioci raznolikosti nalaze na utvrđenim mjestima, jasna su nastojanja da se do istih podataka dođe alternativnim metodama koje ne

podrazumijevaju ekstenzivanu analizu kompletnih sekvenci. Genotipizacijska metoda utemeljena na terminirajućoj jednobaznoj ekstenziji fluorescirajuće označenih ddNTP –a omogućuje nam da tipiziramo izravno i to samo one SNP-ove koje nas interesiraju, bez analize cjelokupne sekvence. **(6,20,21,22)**

Sekvenciranje se danas vrši u kapilarnim automatiziranim DNA sekvencerima, koji su zamijenili elektroforezni gel, mada je princip i dalje isti. Ulogu gela su preuzele kapilare s polimerom visokih performansi, kroz koje se vrši elektroforeza.**(23)** Većina današnjih sekvencera razlikuje module fragmentarne analize i sekvenciranja, mada se obje metode zasnivaju na brzini protoka elektroforeze. Ipak, kod sekvenciranja, fragmenti se veličinom razlikuju samo u jednom nukleotidu, pa stoga elektroforeza mora biti sporija.**(24)** Metoda jednobazne ekstenzije koristi modul fragmentarne analize, identično kao i analiza STR-ova. Kreiranjem početnica 18-25 bp uzvodno od SNP-a, i po potrebi dodavanjem poliT repa početnicama, kreiraju se fragmenti dovoljne veličine za detekciju fragmentarnom analizom. Takav pristup čini proces prikupljanja relevantnih podataka vezanih za sekvencu koju testiramo bržim i manje osjetljivim nego potpuno sekvenciranje regije koja predstavlja područje našeg interesa.

1.3 Opći osvrt: Mitohondrija, građa i uloga

Mitohondrija je organela koja je odgovorna za konverziju energije u format u kojem se može koristiti u pogonu staničnih reakcija. Prisutna je u svim eukariotskim stanicama, i razmjerno sa svojom ulogom u metabolizmu , u pravilu zauzima dobar dio ukupnog volumena stanice.**(25)**

Mitohondrije danas opisujemo kao izdužene cilindre, vrlo slične bakterijama, promjera od 0,5 do 1μm. Ipak, detaljna mikrokinematografija je pokazala da su mitohondrije iznenađujuće mobilne i plastične molekule, koje stalno mijenjaju oblik i kreću se unutar citoplazme. Tijekom tog kretanja može se uočiti povezanost mitohondrija s mikrotubulama, što po svoj prilici određuje smjer i distribuciju mitohondrija u različitim tipovima stanica **(26)**.

Svaki mitohondrion je vezan s dvije visoko specijalizirane membrane (vanjska i unutrašnja) koje igraju ključnu ulogu u njihovoj aktivnosti. Membrane zajedno kreiraju dva zasebna dijela ili prostora unutar mitohondrije, koje nazivamo matrični prostor, kao i puno manji intermembranski prostor. Obje membrane obiluju transportnim proteinima (porin, u vanjskoj membrani), fosfolipidima (kardiolipin, u unutrašnjoj membrani), kao i enzimima koji, između ostalog, metaboliziraju piruvat i masne kiseline, što je sve neizostavno prilikom procesa oksidativne fosforilacije., koji generira većinu ATP u životinjskim stanicama.**(27)**

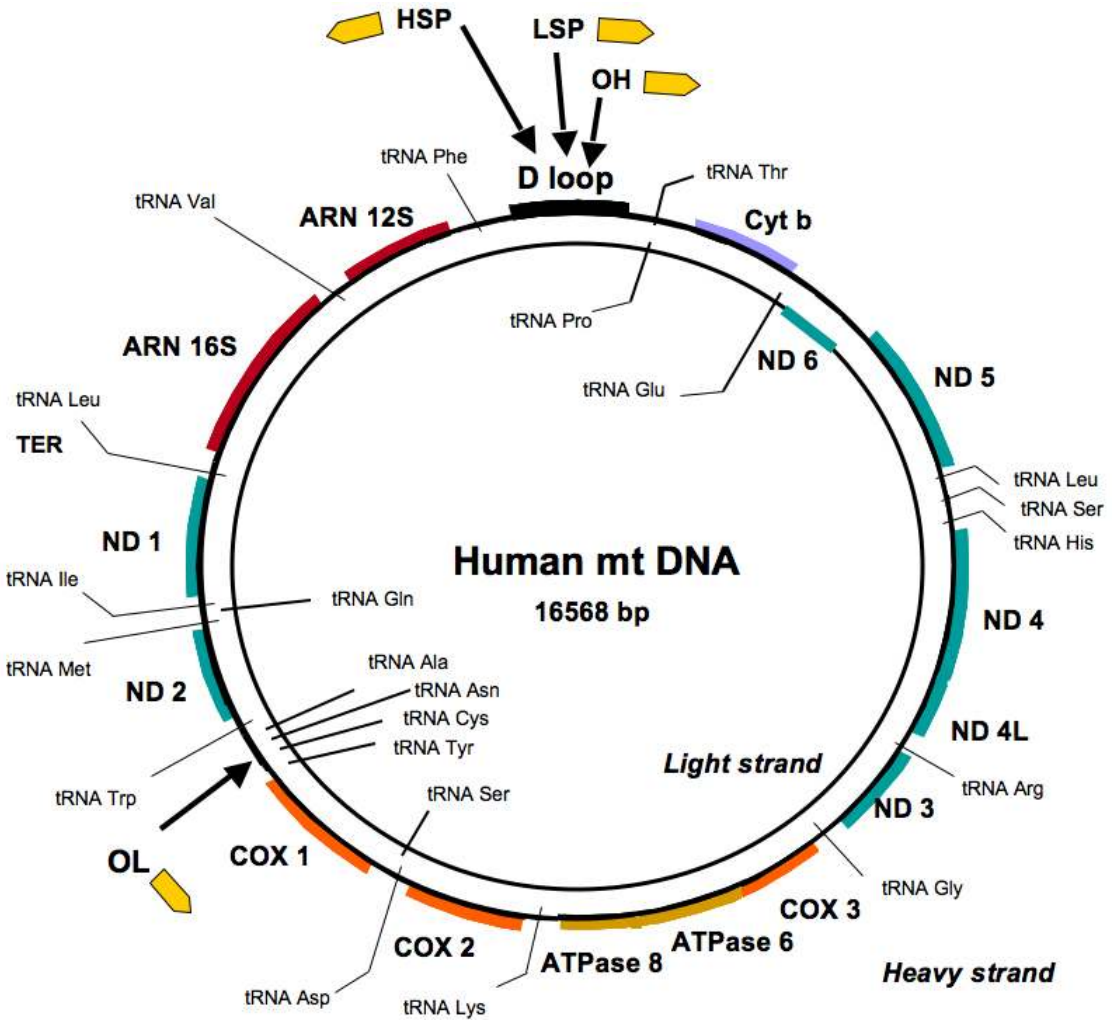
Stanice moraju biti u stanju sintetizirati nove citoplazmične organele, pa tako i mitohondrije ukoliko žele biti sposobne za rast i diobu. Većina proteina u mitohondrijama je kodirano unutar nuklearne DNA, i ulazi u organelu preko citozola, nakon translacije na citozolskim ribozomima. Ipak, postoje i proteini koji su kodirani u samom mitohondrijskom genomu, i sintetiziraju se na ribozomima unutar mitohondrija. **(25)**

1.3.1 Humani mitohondrijski genom

Mitohondrijske DNA molekule su relativno male, i skoro u pravilu, cirkularne, s izuzetkom mitohondrijskih genoma nekih algi i protozoa. Mitohondrijski genom je puno veći u biljnim nego u životinjskim stanicama. Kod sisavaca mitohondrijski genom predstavlja cirkularna DNA molekula od otprilike 16 500 bp, što je otprilike 100 000 puta manje od nuklearnoga genoma.**(28)**

Humana mitohondrijska DNA molekula ima 16569 bp, ima 37 gena koji kodiraju za proteine koji se koriste u već spomenutoj oksidativnoj fosforilaciji. Unutar ove molekule postoji tzv. "kontrolna regija", veličine 1122 bp, gdje se nalazi mjesto inicijalne replikacije jednog od lanaca, ali koje ne kodira za sintezu niti jednog proteina (**29)**

Točan broj bp u molekuli mitohondrijske DNA može varirati uslijed manjih mutacija koje mogu biti insercije ili delecije. Jedan od poznatijih ovakvih fenomena je dinukleotidna ponavljačka regija (AC)5 na poziciji 514-524, za koju je uočeno da varira od (AC)3 do (AC)7.**(30, 31)** (slika 1.1)



Slika 1.1. *Prikaz humanog mitohondrijskog genoma (preuzeto sa www.bioscience.org **(32)**)*

Asimetrična distribucija nukleotida daje podjelu na "teški" i "laki" lanac, kad se mtDNA molekula rastavi u bazičnoj CsCl otopini. "Teški", ili H-lanac (*H-heavy,* eng.) sadrži veći broj gvaninskih nukleotida, koji imaju najveću molekulsku masu od sva četiri nukleotida, nego "Laki", ili L-lanac (L-light, eng.). **(25)** Replikacija mitohondrijske DNA počinje s H lancem, u kontrolnoj regiji, na mjestu koje

nazivamo *D – petlja (displacement loop).* H lanac kodira za 28 genskih produkta, dok L lanac transkribira osam transfernih RNA molekula i enzim ND 6 **(33,34)**

Humana mitohondrijska DNA se nasljeđuje isključivo od majke. Kod oplodnje samo jezgra spermija ulazi i spaja se direktno sa jezgrom jajašca. Sperma biološkog oca ne doprinosi zigoti nikakvim drugim staničnim komponentama. Kada se zigota počne dijeliti i formira se blastocista, citoplazma i svi ostali dijelovi stanice, osim jezgre, su konzistentni sa originalnom jajnom stanicom majke. **(35)** Samim tim, mitohondrije, zajedno sa svojim genomom se prenose direktno od majke na potomstvo, i potpuno su neovisne od bilo kakvog utjecaja biološkoga oca. **(36)** U forenzičkoj praksi, ovo znači da dobivena mtDNA sekvenca nije unikatna za pojedinca koji je ostavio trag, ali, isto tako, omogućuje praćenje neprekinutih nasljednih linija po majci, što može biti od velikog značaja.**(4)**

U praksi, moguć je prelazak malog broja mitohondrija iz spermija u zigotu, ali broj mtDNA molekula u jajašcu se kreće oko 100 000, što stvara izuzetno veliko razrjeđenje za one koje su uspjele prijeći. Nadalje, sve mitohondrije koje su uspjele prijeći iz spermija nose ubikvitinski biljeg, koji dobiju prilikom spermatogeneze, i koji ih, čini se markira za degradaciju od strane novoformirane stanične mašinerije embrija. **(37,38,39)**

Promjene u mtDNA su povezane s većim brojem stanja u medicini. **(40)** Također, evolucijski biolozi ispituju varijacije u sekvenci mtDNA između vrsta radi uspostavljanja korelacija. **(22)** Dobar primjer ovoga je otkriće da neandertalci nisu direktni preci modernih ljudi, do kojeg je došlo analizom i usporedbom sekvenci kontrolne regije mtDNA dobivene iz kostiju iz toga doba. **(41)** Neprekinuta linija nasljeđivanja po majci može biti od neprocjenjive vrijednosti u evolucijskoj genetici, tako da imamo veliki broj studija koje se u donošenju zaključaka oslanjaju na tu karakteristiku mtDNA.**(42)**

Treba napomenuti da se pojedine delecije, insercije i točkaste mutacije mtDNA unutar spermija neke studije dovode u vezu sa muškim infertilitetom. Također, zabilježene su mutacije na mitohondrijskom genomu koje se pripisuju procesu starenja stanice. **(43)**

Posljedica svega ovoga je da majka prenosi egzaktnu kopiju mitohondrijskog genoma na kompletno potomstvo (osim u slučaju mutacije), tako da individualna mtDNA nije unikatna za samo jednu osobu, onako kako smo to navikli kod nuklearne DNA.**(29)**

1.3.2. Heteroplazmiji mtDNA

Humani mitohondrijski genom ima dokazanu pojavu heteroplazmija, odnosno prisutnosti više od jednog tipa mtDNA u uzorcima uzetim od iste osobe. Heteroplazmije se mogu pojaviti na razini jedinke, stanice, ili čak mitohondrija. Ekstenzivnost heteroplazmije pomalo zalazi u područje teorije, budući da su mnogi od njih ispod razine detekcije sekvencione analize. Uzimajući u obzir da u zigoti s jednom kopijom nuklearnoga genoma već postoji preko 100 000 kopija mitohondrijskoga genoma, kao i da geni na mtDNA evoluiraju 6-17 puta brže od jediničnih kopija nuklearnih gena, pojava heteroplazmija je logičan rezultat takve situacije.**(44)** Pojava heteroplazmija na dva mjesta kod iste jedinke se naziva triplazmija, i pojavljuje se mnogo rjeđe. Pojava više od jedne heteroplazmije unutar 610 bp HV regija 1 i 2 testiranih u klasičnoj forenzičkoj DNA analizi je izuzetno rijetka, i obično upućuje na pogreške u amplifikaciji i sekvenciranju uzoraka. Kontaminacija i/ili veliki broj amplifikacijskih ciklusa su najčešći uzroci takvih profila.**(4)**

Heteroplazmiji mogu biti promatrani na nekoliko načina: osobe mogu imati više od jednog tipa mtDNA unutar istog tkiva, i/ili osobe mogu imati razlike u tipovima mtDNA između različitih tkiva. Heteroplazmiji mogu biti sekvencijski (razlika u dušičnoj bazi), koja se ogleda prisutnošću dva nukleotida na jednom lokusu prilikom sekvencione analize, ili dužinski (insercija/ delecija), koja se najčešće susreće kod homopolimerične C-regije (*C-stretch).* **(45)** O heteroplazmičnosti mitohondrijskog genoma, naročito njegove HV regije, uvelike se raspravlja u znanstvenim krugovima koji se bave forenzičkom DNA tipizacijom, posebno kod testiranja uzoraka dlake i korijena dlake. Pojedine studije ukazivale su i na prisutnost heteroplazmija unutar jedne individue na testiranim korijenima

dlake. **(46)** Ovo otkriće je bilo žustro komentirano od strane većine vodećih znanstvenika iz područja forenzičke mtDNA analize, koji su za opservirane rezultate krivili veliki broj ciklusa u amplifikaciji materijala.**(4,47)** S obzirom da je procesiranje uzoraka dlake jedno od najčešćih područja forenzičke mtDNA analize, kao mjesto gdje je potencijal metode najbolje izražen, ono je od početka primjene predmet studija i smjernica. **(48)** Kao rezultat svega toga, danas postoje protokoli testiranja mtDNA koji preporučuju sekvenciranje nekoliko dlaka od iste individue, kako bi se sa sigurnošću potvrdila prisutnost hetroplazmija.**(49)** Utvrđena mjesta na kojima je pojava heteroplazmija česta (*žarišta)* uključuju sljedeće pozicije u HV1 i HV2 regijama: 16093, 16129, 16153, 16189, 16192, 16293, 16309, 16337 (HV1), i 72, 152, 189, 207, 279 (HV2). **(44)**

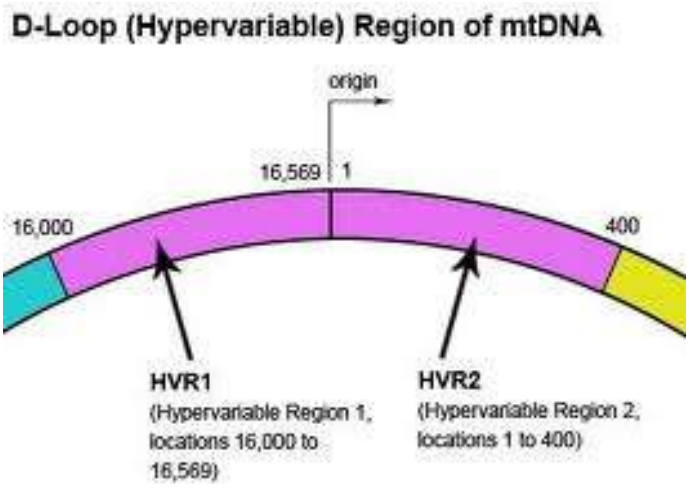
Interesantno je spomenuti da je populacija s hrvatskih jadranskih otoka poznata po relativno visokom stupnju heteroplazmija u mtDNA, što se objašnjava njezinom relativnom geografskom izolacijom. Učestalost pojave haplogrupa u tom dijelu Hrvatske je osjetno iznad prosjeka za jugoistočnu Europu. **(50,51)**

Heterpolazmija na mtDNA ostaje stabilna tijekom vremena, tako da je nasljedna, a ne u povezanosti sa starošću jedinke **(52)**. Postoji istraživanje u kojem je pronađena različita učestalost heteroplazmija u različitim tkivima, a u kojoj se mišićno tkivo prikazuje kao najpodobnije.

Prilikom analize slučajevi heteroplazmičnosti, kontaminacije i pomiješanosti genetskoga materijala se na prvi pogled ne mogu jasno razlikovati, pa zbog toga moraju postojati čvrste smjernice u određivanju profila i međusobnom uspoređivanju spornih i nespornih uzoraka. Iako pojave heteroplazmija mogu dodatno zakomplicirati interpretaciju rezultata mtDNA analize, njihova prisutnost na identičnim mjestima može nekad pozitivno djelovati na statistiku podudaranja, kao što smo vidjeli prilikom identificiranja ruske carske obitelji Romanov.**(53)** Stupanj pojavljivanja heteroplazmija na mtDNA nije ni u kojem slučaju potpuno istražena tema, što pokazuju i istraživanja objavljena u zadnjih par godina. **(54)**

1.3.3. Kontrolna regija (*D-loop*), hipervarijabilne regije i njihova forenzička primjena

Kako smo već naglasili, najekstenzivniji stupanj varijacija u mtDNA humane populacije se primjećuje unutar kontrolne regije. To se posebno odnosi na dvije regije unutar kontrolne , koje zovemo hipervarijabilne regije I i II (HVI i HVII). Osim što se unutar nje nalazi sekvenca koja inicira replikaciju jednog od lanaca mtDNA, ujedno se tu nalaze i sekvence za iniciranje transkripcije oba lanca (slika 2.1)



Slika 1.2. *Hipervarijabilne regije mtDNA (preuzeto sa www.genebase.com)*

Od 1122 bp kontrolne regije, u forenzičkoj praksi se najčešće sekvencira njih oko 610, njih 342 iz HVI regije, i 268 iz HV2 regije. Preciznije, radi se o sekvencama između nukleotida 16024 i 16365 za HVI regiju, i 73 i 340 za HV2 regiju, i, kao što je već spomenuto, rezultati se navode u odnosu na referentnu Anderson ili CRS sekvencu. **(9,10)** Prosječan diverzitet nukleotida unutar ovih regija iznosi 1,7%, odnosno, točnije, 7-14 nukleotida od 610 sekvenciranih se razlikuje. Postoji i treća HV regija, HVIII, koja je dužine 137 bp, i koja nekad može pomoći prilikom

separiranja uzoraka identičnih HV1 i HV2 sekvenci, ali njezino sekvenciranje nije standardna praksa.**(4)**

1.3.4. Jezgreni pseudogeni

Segmenti mitohondrijskoga genoma su prisutni u humanom nuklearnom genomu. Ovi pseudogeni predstavljaju molekularne fosile koji su posljedica inkorporacije dijela mitohondrijskoga genoma u nuklearni tijekom evolucije, premda je prema pojedinim studijama spomenuta migracija kontinuirani proces koji se odvija u realnom vremenu. **(55)** Kromosom 11 je pokazan kao nosilac dijela genoma kontrolne regije, što pokazuje prethistorijsku transpoziciju s jednog genoma na drugi. Opisana regija na kromosomu 11 se razlikuje za otprilike 7,5% od moderne prikazane sekvence kontrolne regije, i nema izvještaja o interferenciji s procesiranjem forenzičkih uzoraka.**(56)**

Ovi nuklearni fosili, kako smo ih nazvali, mogu napraviti potencijalne komplikacije u slučajevima identifikacija putem analize mtDNA. Problem može nastati ako se oni amplificiraju umjesto ciljane mtDNA regije, u slučajevima kada se koristi veliki broj PCR ciklusa kod uzoraka posebno teških za analizu. U takvim uvjetima, moguće je da pseudogeni kontaminiraju pravu i ciljanu mtDNA sekvencu. Ipak, broj kopija pseudogena je znatno manji od broja kopija mtDNA, pa dokle god se pri testiranju broj PCR ciklusa drži na 40 ili ispod, oni ne predstavljaju realnu opasnost u forenzičkom testiranju.**(4)**

Izučavanje spomenutih pseudogena je dosta korišteno u evolucijskoj genetici. Pojedina istraživanja pokazuju zemljopisnu povezanost uzorka sekvenci pseudogena, što može biti korisno u istraživanjima tragova porijekla. **(57)**

1.3.5 Forenzička primjena analize mtDNA

Prva metoda mjerenja varijacija mtDNA uključivala je upotrebu RFLP- a (*Restriction Fragment Length Polymorphisms)*, bila je relativno nisko rezolucijska, i oslanjala se je na uporabu pet ili šest restrikcijskih enzima. Veća rezolucija

varijabilnosti dobivena je kada je u analizu uvršteno 9 preklapajućih fragmenata amplificiranih putem PCR-a, koji su potom digestirani s 12 ili 14 restrikcijskih enzima.**(4)**

Godina koja se uzima kao početak praktične primjene analize mtDNA kakvu danas poznajemo i upotrebljavamo u forenzičkim vještačenjima za potrebe krivičnoga procesa je 1996., odnosno vještačenje HV regija u slučaju Tennessee vs. Ware. **(58)** Iako je uspješno korištena na gotovo svim prikupljenim uzorcima, forenzička aplikacija mtDNA je postala sinonim za procesiranje degradiranih skeletalnih uzoraka kod identifikacija **(59,60)**, ili procesiranja prikupljenih dlaka bez korijena u kriminalističkoj forenzičkoj praksi.**(61)** Iako se većina forenzičkog DNA testiranja danas vrši na STR-ovima nuklearne DNA, mtDNA nudi dvije velike prednosti: 1. tisuće kopija mtDNA su prisutne u stanici naspram samo dvije nuklearne DNA, i 2. način nasljeđivanja mtDNA nam omogućuje da pratimo majčinsku liniju čak i do daljih rođaka osumnjičenog, u slučajevima kada on ili ona nisu dostupni.**(62,63)** O tome jesu li SNP-ovi ili STR-ovi budućnost forenzičke DNA analize, znanstvena zajednica lomi koplja već nekih petnaestak godina tijekom kojih je jačina argumenata već nekoliko puta mijenjala stranu. Statistička superiornost STR-ova s jedne, i velika osjetljivost SNP-ova, s druge strane, čini se osiguravaju objema metodama dalju primjenu u forenzičkoj praksi.**(64)**

Laboratorijske metode za forenzičko testiranje mtDNA su se mijenjale vrlo malo od uspostave prvobitnog protokola utemeljenog na Sangerovom sekvenciranju.**(1)** Na ekstrahiranoj DNA s uzoraka analiziraju se HV1 i HV2 regije, u četiri preklapajuće reakcije za sporne uzorke, od kojih svaka obuhvaća otprilike 300 bp. Jednaka analiza se provodi i na referentnim uzorcima, samo što je dozvoljeno učiniti samo dvije reakcije, uzimajući u obzir da genetski materijal sa referentnih uzoraka nije degradiran. U ranim devedesetima na Penn State Univerzitetu je razvijana metoda korištenja "mini početnica" s ciljem boljeg profiliranja jako degradiranih uzoraka. Ta metoda, koja se sastoji od korištenja osam parova početnica koje kreiraju amplifikate od manje od 200 bp, usvojena je kao standardna u Laboratoriji oružanih snaga SAD (AFDIL), te je pokazala povećanu osjetljivost. **(65)**

Ekstenzivnom analizom HV regija utvrđena su žarišta pojave SNP-ova, karakteristična za individualne etničke skupine. Zbog toga, formiranje populacijskih studija karakterističnih za područje gdje se vrše vještačenja je obvezno, ukoliko se rezultati žele prikazati s pripadajućom statistikom. Ukoliko populacijska studija ne postoji za dano područje, rezultati vještačenja se prijavljuju samo kao razlike od referentne sekvence, ili, alternativno, može se koristiti opća statistika na temelju rase. **(4,10,61)** Danas je standardna praksa da populacijske studije budu kreirane na razini država, mada postoje i regionalne, u slučaju kada je to potrebno radi veće zastupljenosti etničkih manjina karakterističnih za neko područje.**(66)** Prosinac 2000. godine uzima se kao početak populacijske genetike mtDNA, zbog objave 53 potpuna genoma mtDNA, koji potiču od različitih grupa individua koji su predstavnici populacija širom svijeta. Od 2004. preko 1.000 različitih potpunih mitohondrijskih genoma postoje u javnim DNA bazama podataka. **(4)**

Atributi mtDNA čine je metodom izbora kod testiranja izuzetno starih uzoraka iz istih razloga koji joj daju prednosti nad nuklearnom DNA: izgledi za dobivanje profila su veći, a prateći kontinuiranu maternalnu liniju možemo doći do referentnih uzoraka i nekoliko generacija poslije. Tako je uporaba mtDNA analize rezultirala u identifikaciji mnogih povijesnih ličnosti, kao sto su čuveni odmetnik Jesse James, dva potomka Ruske carske obitelji Romanov, a korištena je i u reidentifikaciji žrtava sa Titanika, da spomenemo samo neke. **(39,67,68)**

Osnovna slabost forenzičke mtDNA analize, osim ograničene statističke moći ekskluzije, o kojoj smo već govorili, ogleda se u činjenici da obično ne može biti korištena u procesiranju uzoraka koje je nemoguće razdvojiti prije testiranja. Takvi uzorci, koji su sačinjeni od kompleksnih mješavina, prilikom analiziranja podataka mogu na nekoliko načina stvoriti probleme, od supresije nisko zastupljenog genetskog profila, do potpune nečitljivosti sekvence izazvane kombinacijom dva ili više profila.**(69,70)**

Primjena analize mtDNA u forenzici nije ograničena samo na uporabu humanog genetskoga materijala. Zoološko i botaničko forenzičko DNA tipiziranje je u široj upotrebi više od 10 godina, a potentnost analize mtDNA u tipiziranju vrsta čine i ovu metodu njihovim dijelom.**(71)**

Sastavni dio svakog DNA vještačenja, pa tako i vještačenja mtDNA je korištenje računarskih programa za analizu i pravilno usklađivanje sekvenci, kao i kreiranje i upotreba baza podataka. Danas je dostupan velik broj programa koji nam olakšavaju analizu i poravnavanje sekvenci koje analiziramo. Veliki broj njih se može skinuti s interneta, a osim programa koji obavljaju analize uzoraka, postoje i oni koji nam pomažu u kreiranju početnica kao i predviđanjima njihovih međusobnih interakcija kod multipleksiranja. **(72,73)**

Korištenje baze podataka kao stalnoga izvora referentnih uzoraka iznimno povećava učinkovitost svih vrsta forenzičnog DNA testiranja. Uz postojanje STR baza podataka u mnogim zemljama, također je oformljena i SWGDAM (*Scientific Working Group on DNA Analysis Methods)* mtDNA baza podataka. Rad i ažuriranje baze je pod kontrolom FBI, a pristup imaju ustanove registrirane za vršenje vještačenja u SAD-u. **(74,75)** Kroz djelovanje EDNAP-a (*the European DNA Profiling Group)*, stvorena je međunarodna baza podataka nazvana EMPOP (*EDNAP mtDNA Population Database*). EMPOP predstavlja internacionalni kolaboracijski projekt između svih laboratorija koji se bave analizom mtDNA i DNA laboratorija Instituta za sudsku medicinu u Innsbrucku, Austrija, s ciljem da se stvori direktno pristupačna populacijska baza podataka, koja se može koristiti u redovnom obavljanju vještačenja.**(76)**

1.3.6 Statistička analiza u primjeni forenzičke DNA analize mtDNA

Kako smo već spomenuli mtDNA se u potpunosti nasljeđuje od majke, bez mogućnosti rekombinacije kao kod nuklearne DNA. Stoga, individualne pozicije nukleotida se nasljeđuju "u paketu", i moraju biti tretirane kao jednolokusni haplotip, na isti način kako tretiramo podatke dobivene s testiranja Y kromosoma. Pravila koja vrijede kod neovisne segregacije STR lokusa koji se nalaze na različitim kromosomima ne mogu biti korištena u statističkoj analizi mtDNA polimorfizama.**(4)**

Današnja praksa izračunavanja rijetkosti dobivene mtDNA sekvence između nesrodnih pojedinaca se temelji na učestalosti pojavljivanja takve sekvence unutar baze podataka, ili populacijske studije. Ovakav pristup se naziva "metoda brojanja", i

u potpunosti zavisi od broja uzoraka prisutnih u bazi ili studiji na koju se oslanja. Samim tim, veći broj uzoraka uzetih od nesrodnih pojedinaca u referentnoj studiji automatski znači bolju statističku procjenu za pojavu slučajnog podudaranja.**(77)**

Veliki broj tipova mtDNA nema utvrđenu populacijsku frekvenciju, jer se u bazama podataka pojavljuju samo jednom.**(70)** Ipak, mogu se utvrditi gornje i donje granice povjerenja za kalkulaciju frekventnosti određenog tipa mtDNA.**(1)**

Postoje i alternativni načini izračunavanja statističke signifikantnosti mtDNA podudaranja. Na primjer, predloženi su omjeri vjerojatnosti (*likelihood ratios*) za pojedine mtDNA tipove **(1,4)**. Bez obzira koja se metoda statističkog proračuna koristi, važno je zapamtiti da mtDNA nikad ne može imati diskriminacijsku snagu STR testiranja.

1.4 Pregled dosadašnjih istraživanja relevantnih za identifikaciju i detekciju žarišta SNP-ova

Istraživanja vezana za forenzičku upotrebu mtDNA možemo teorijski podijeliti u tri pravca. Prvi se tiče tehnologije analize mtDNA, što u praksi znači traženja alternative standardnom sekvenciranju HV regija po Sangeru. Drugi je otkrivanje SNP-ova koji imaju forenzički potencijal unutar testirane populacije. Treći pravac podrazumijeva kreiranje efikasnih populacijskih studija s propratnom statistikom u svrhu povećavanja diskriminacijskog potencijala analize. Ova tri pristupa se vrlo često isprepliću, i rijetka su istraživanja koja se isključivo bave samo jednim od njih. **(58)**

Kako je već prethodno naglašeno, prva sekvenca humane mtDNA je plod rada u laboratoriji Fredericka Sangera, u Cambridge, Engleska. Prema autorima ovoga rada, Anderson *et al,* danas se referentna sekvenca mtDNA naziva Andersonovom, u usporedbi s kojom se prezentiraju novodobivene sekvence, što do danas predstavlja najreferentnije istraživanje u tom području istraživanja.**(9)** Andersonova sekvenca se također naziva i kao Cambridge Reference Sequence (Cambridge Referentna Sekvenca ili CRS).

Originalna Andersonova sekvenca je dobivena iz uzorka placente, i predstavljala je većinom genetski materijal individue europskoga podrijetla, ali je na pojedinim mjestima morala biti nadopunjena sa sekvencama iz HeLa stanica i bivolje mtDNA, zbog pukotina nastalih radi ranih rudimentarnih sekvencionih procedura. Još 1989. Murray prezentira poboljšanja u metodi sekvenciranja dvolančane DNA, što je rezultiralo znatno manjim gubitkom nukleotida tijekom elektroforeze.**(78)** S daljnjim poboljšanjima u tehnologiji sekvenciranja, 1999 originalni materijal, korišten od strane Andersona i njegovih suradnika, je re-sekvenciran radi utvrđivanja CRS. Re-analiza je potvrdila sve osim 11 nukleotida navedenih u originalnoj sekvenci iz 1981., od kojih se nijedan ne nalazi u općekorištenoj kontrolnoj regiji, tako da je potvrđeno da je originalna Andersenova sekvenca iz 1981. identična CRS iz 1999. u obje hipervarijabilne regije koje se koriste u forenzičkoj analizi. Jedna od nekonzistentnosti između dviju referentnih sekvenci je gubitak jednog citozinskog nukleotida na poziciji 3106, što znači da je veličina referentnog genoma 16568 bp, a ne općeprihvaćenih 16569 bp.**(10)**

Sangerova metoda sekvenciranja DNA je prvi put objašnjena prije vise od 30 godina, i predstavlja, ako ne najvažnije, onda sigurno otkriće s najvećim brojem aplikacija u modernoj molekularnoj genetičkoj analizi. Ova metoda, za koju je njenom autoru uručena Nobelova nagrada, zasniva se na inkorporaciji dideoksiribonukleotidnih (ddNTP) fosfata od strane polimeraze umjesto normalnih N-trifosfata, u ulozi terminatora dalje elongacije DNA lanca. Daljnja elongacija lanca nije moguća radi toga što nema hidroksilne grupe na 3' kraju ddNTP nukleotida. Kompletno sekvenciranje u Projektu humanog genoma je napravljeno korištenjem ove metode**.(17,18)**

Metoda sekvenciranja po Sangeru prvobitno je dizajnirana za obavljanje na elektroforeznom gelu. Pojavom prvih automatiziranih DNA sekvencera, metodu je trebalo prilagoditi flourescentnoj detekciji pomoću lasera, prvo na umetnutom gelu, a kasnije i u kapilarama koje su ga zamijenile. Radovi Smith et al. su posebno doprinijeli u sintezi flourescentnih početnica neophodnih za automatsko DNA sekvenciranje. (**79,80)**

Jedno od prvih istraživanja koje govori o forenzičkoj uporabi DNA diverziteta je rad Gill et al., koji koristi Southern blot tehnologiju u detekciji, metodu izbora u godini kada je rad objavljen (1985.). **(81)** Vrlo značajno istraživanje koje je ukazivalo na polimorfičnost kontrolne regije provedeno je od strane Horai et al.**,** a na koje se nadovezao Bendall et al. Oba istraživanja ukazuju na HV regije kao žarišta točkastih mutacija, čime su one obilježene kao primarni ciljevi forenzičkoga testiranja humane mtDNA.**(82,83)** Butler i Levin su 1998. u svojoj publikaciji detaljno opisali potencijale ali i ograničenja forenzičke mtDNA analize, zajedno s detaljnim opisom raportiranja i usporedbe dobivenih rezultata.**(13)** Iste godine sličnu studiju objavljuje i Fourney, samo što stavlja veći naglasak na praktičnu primjenu u dokaznom postupku.**(84)**

Sve šira primjena ove metode zahtijevala je viši stupanj standardizacije procedura i rezultata između laboratorija koje je prakticiraju. Djelujući unutar Medjunarodnoga društva za forenzičku genetiku (*International Society for Forensic Genetics)*, Carracedo et al. su 2000. objavili smjernice kojih bi se svi laboratoriji koji provode testiranje trebali pridržavati. **(15)**

S rastućom mogućnošću detekcije, odnosno napretka tehnologije sekvenciranja, hipervarijabilnost kontrolne regije je potvrđena i objašnjena. Još 1997., Parsons et al., a dvije godine kasnije i Meyer et al., bavili su se utvrđivanjem stupnja supstitucije i heterogenetičnosti unutar regija HV1 i HV2, na čiji su se rad nadovezali Melton et al. **(85,86)** Meltonov doprinos se nastavlja i objavom retrospektivnog istraživanja koje je obuhvaćalo dvije godine procesiranja mtDNA za potrebe kaznenoga postupka. **(2)**

Usporedno s tehnološkim napredovanjem metode počele su se objavljivati i populacijske studije neophodne za potpunu implementaciju testiranja u kaznenom postupku. Walther Parsons et al. objavljuju 1998. jedno takvo istraživanje koje je obuhvaćalo 101 pojedinca, zajedno s pripadajućom statistikom i modelom primjene studije u svakodnevnoj forenzičkoj praksi. **(87)** Slično istraživanje, samo s upola manjim uzorkom, iste godine objavljuju i Rousselet i Mangin, i ono je korišteno kao referenca prilikom uvrštavanja mtDNA analize na listu vještačenja prihvaćenih u Francuskoj.**(88)** Također**,** Parsons i Bandelt 2007. godine objavljuju smjernice

uzimanja i procesiranja populacijskih uzoraka koji će biti upotrijebljeni u forenzičkoj praksi. **(89).** Neke od objavljenih populacijskih studija sadrže i podatke za HV3 regiju, u tu grupu spada istraživanje koje provode Hoong i Lek, koje se bavi polimorfizmima malajske populacije. **(90)** Slične populacijske studije provedene su i u regiji jugoistočne Europe, od kojih je posljednja publicirana u radu Zgonjanin et al., koji se odnosi na polimorfizme kontrolne regije u populaciji Vojvodine.**(91)**

Istraživanja relevantna za ovu problematiku nisu ograničena samo na kontrolnu regiju mtDNA. Osnovna namjera testiranja cjelokupnoga genoma mtDNA je povećavanje diskiriminantnosti u forenzičkom testiranju, kako je i opisano u istraživanju Parsons et al, iz 2001., koje je identificiralo grupe između 8 i 10 dodatnih SNP-ova koji se nalaze raspoređeni po mitohondrijskom genomu mimo HV regija, i koji su zadovoljili postavljene standarde. Ove grupe SNP-ova su omogućile diferenciranje između uzoraka koji su pokazivali najčešću sekvencu kontrolne regije u populacijama bijelaca, afroamerikanaca, i ljudi latinoameričkog podrijetla. **(92)** Coble et al. su se nadovezali na ovu studiju, ali su u njihovom istražvanju bile uključene osobe isključivo kavkaskoga podrijetla koje su pokazivale identične sekvence kontrolne regije.**(93)**

Objavljene studije, koje su relevantne za drugi dio ovoga istraživanja, a tiču se izrade protokola alternativnih metodi sekvenciranja HV1 i HV2 regija po Sangeru, predvodi studija objavljena još 1991. godine od strane Stoneking et al, koja je obradila varijacije na kontrolnoj regiji humane mtDNA, detektirane putem enzimatske amplifikacije i uporabe specifičnih oligonukleotida.**(94)** Tully et al. su 1996. predočili metodu brze detekcije SNP-ova kontrolne regije pomoću mini-sekvenciranja. Ta se metoda također oslanja na jednobaznu ekstenziju, sa završnom detekcijom na poliakrilamidnom gelu. **(95)** Livak 1999. objavljuje rezultate istraživanja detekcije alela putem korištenja flourescentnih oligonukleotida, s detekcijom na automatiziranim DNA sekvencerima. **(96)** Alternativu predstavlja metoda koja se zasniva na uporabi specifičnih oligonukleotida za određene sekvence (SSO – *Sequence-Specific Oligonucleotides)*, imobiliziranih na membrani detekcijskih traka na koje hibridiziraju PCR produkti. Vezanje oligonukleotida za odgovarajuću sekvencu rezultira stvaranjem plave precipitirajuće trake, kao rezultat

reakcije sa streptavidinom i peroksidazom, kako je objasnio Divine et al. u istraživanju testiranja regija HV1 i HV2 kontrole regije. **(20)** LaBarge et al. su 2003. objavili istraživanje u kojem su koristili tekućinsku kromatografiju visokih performansi kao metodu detekcije. Iako izuzetno učinkovita u smislu brzine analize velikog broja uzoraka i cijene pojedinačne analize, metoda značajno gubi na osjetljivosti u usporedbi s analizama izvršenim na automatiziranim DNA sekvencerima.**(5)**

Valone et al. su otišli korak dalje, i u njihovom istraživanju iz 2004. su obuhvaćeni SNP-ovi sa cjelokupnog mitohondrijskoga genoma, s načinom detekcije koji se oslanja na jednobaznu ekstenziju, kao što je planirano i u ovom istraživanju. Ovo je istraživanje značajno i zbog toga što je prezentiralo žarišta pojave SNP-ova u testiranoj populaciji, kao i sekvence početnica neophodnih za jednobaznu ekstenziju na označenim lokusima. **(97)** Vrlo slični rezultati, kada je u pitanju kontrolna regija, su prezentirani u studiji Quintanas et al, koja je objavljena iste godine.**(6)** Razlika u spomenute dvije studije je bila u populaciji unutar koje je istraživanje provedeno; Valone et al. su koristili uzorke iz Sjeverne Amerike, dok uzorci korišteni u radu Quintanas et al. potječu od osoba iz španjolske pokrajine Galicije.

Primjena i učinkovitost metode jednobazne ekstenzije kroz upotrebu ABI SNAP Shot Kita je jasno prikazana u istraživanju autora Drobnic et al, publiciranom 2010. godine. Iako se bavi tipizacijom 49 autosomalnih SNP-ova u populaciji Republike Slovenije, studija pruža vrlo detaljne smjernice u kreiranju i multipleksiranju početnica za proces jednobazne ekstenzije, kao i nove argumente za uporabu SNP u modernoj forenzičkoj analizi.**(21)** Istraživanje provedeno i objavljeno od strane Argac et al. ukazuje na 10 SNP-ova koji se ne nalaze u kontrolnoj regiji, i koji su također tipizirani metodom jednobazne ekstenzije koristeći se ABI SNAP Shot kitom. Ono se, između ostalog, bavi i optimizacijom amplifikacijske mješavine za jednobaznu ekstenziju, koja rezultira poboljšanjem kvalitete podataka dobivenih sekvenciranjem. **(3)**

2. Hipoteza

Radna hipoteza

Populacija BiH sadrži karakteristične SNP-ove unutar kontrolne regije mtDNA čije poznavanje je prijeko potrebno za detaljnu forenzičku dijagnostiku, i za čiju tipizaciju je moguće kreirati protokol na bazi jednobazne fluorescentne ekstenzije. Raspodjela karakterističnih SNP-ova će se statistički značajno razlikovati od populacijskih studija navedenih u literaturi. Reproducibilnost rezultata tipizacije SNP-ova metodom jednobazne ekstenzije će biti potpuna u usporedbi s rezultatima dobivenim sekvenciranjem po Sangeru, dok ce osjetljivost metode jednobaznom ekstenzijom biti veća, naročito kod miješanih uzoraka.

3. Ciljevi istraživanja

1. Utvrditi žarišta pojavljivanja SNP-a u populaciji BiH, i utvrditi zastupljenost alternativnih inačica na istim.
2. Usporediti dobivene populacijske podatke s europskim studijama dostupnim u literaturi, kao i statističku signifikantnost podudaranja profila unutar istih.
3. Kreirati početnice specifične za utvrđena žarišta, čime se omogućuje njihova detekcija metodom jednobazne ekstenzije.
4. Kreirati i optimizirati protokol detekcije jednobaznom ekstenzijom, usporediti njegovu primjenjivost, specifičnost i sposobnost tipizacije miješanih uzoraka u usporedbi s potpunim sekvenciranjem HV-1 regije po Sangeru

4. Materijali i metode

Testiranje je u ovom istraživanju podijeljeno u tri faze. Prva se odnosi na odabir, obilježavanje i prikupljanje uzoraka pogodnih za provođenje istraživanja. Druga faza se sastoji od testiranja neophodnih za dobivanje pune sekvence HV1 regije mtDNA, nužne za utvrđivanje žarišta pojavljivanja SNP-ova u populaciji odabranih uzoraka. Treća faza se sastoji od testiranja neophodnih za provođenje protokola testiranja utvrđenih SNP-ova putem protokola zasnovanog na jednobaznoj ekstenziji.

Sav laboratorijski posao je odrađen na Odsjeku molekularne dijagnostike i citologije Instituta za patologiju, Kliničkog centra Univerziteta u Sarajevu, uz dozvolu Etičkoga povjerenstva te ustanove.

4.1 Zadaci

- odabir i uzimanje uzoraka
- izolacija DNA
- kvantifikacija izolirane DNA
- amplifikacija izolirane DNA
- detekcija amplifikata na elektroforeznom gelu
- sekvenciranje produkata PCR-a
- stvaranje početnica namijenjenih za jednobaznu ekstenziju
- fragmentarna analiza s pripremljenim početnicama za jednobaznu ekstenziju
- “multiplexing” početnica za jednobaznu ekstenziju

4.2 Uzorak

Ovo istraživanje je provedeno na uzorku od 300 nesrodnih pojedinaca koji su rođeni i žive na teritoriji Bosne i Hercegovine. Sve osobe od kojih su uzeti uzorci su dale pisani pristanak. Svim uzorcima je dodijeljena šifra pod kojom su dalje

procesuirani. Ključ između imena i dodijeljenih šifri je jedan *Excell* dokument koji je po završetku istraživanja izbrisan.

Uzorci korišteni u istraživanju su uzeti u vidu briseva bukalne sluznice (slika 4.1). Korišteni su sterilni štapići s vrhom od vate i sa zaštitnim košuljicama (slika 4.2) Svakoj osobi uzeta su po dva brisa. Svi uzorci su po završetku studije uništeni spaljivanjem.



Slika 4.1 *Uzimanje brisa bukalne sluznice*



Slika 4.2 *Štapići za uzimanje brisa*

Od ukupnoga broja uzetih uzoraka, 188 je uzeto od muškaraca, a 112 od žena.

4.3 Izolacija DNA

DNA je izolirana iz uzetih uzoraka koristeći se Qiamp DNA mini kitom (slika 4.3) i priloženim protokolom. **(98)**



Slika 4.3 *Reagensi sadržani u Qiagen Qiamp DNA mini kitu*

Završna zapremina tekućine u kojoj je izolirana DNA iznosi 190 ul. Tek izolirana DNA koja je bila korištena u narednih 48 sati je čuvana na 2 – 8 ˚C, dok je ostatak pohranjen na -20 ˚C.

Izolirana DNA je kvantificirana koristeći ABI Quantifiler kit (slika 4.4), metodom RT-PCR-a. Reakcije su pripremljene prema priručniku za korištenje upotrijebljenog kita.**(99).** Kvantifikacija je izvršena na aparatu ABI 7700 Sequence Detection System (slika 4.5), koristeći SDS 1.9.1 Alias Detection Software, na Mac OS 8.4 platformi.



Slika 4.4 *Kemikalije iz ABI Quantifiler kita*



Slika 4.5 *Instrumet ABI 7700 Sequence Detection System*

4.4 Amplifikacija DNA

Izolirana DNA je amplificirana koristeći se početnicama F 15971 (prednja) i R 16410 (zadnja) **(1)**. Sekvence početnica su prikazane u tablici 4.1.

Tablica 4.1 *Početnice korištene u amplifikaciji HV1 regije*

Početnica	**Sekvenca**
F 15971	5' – TTAACTCCACCATTAGCACC – 3'
R 16410	5' – GAGGATGGTGGTCAAGGGAC – 3'

U amplifikaciji izolirane DNA korišten je Jena Biosciences Taq Master High Yield PCR Master Mix, u omjerima prezentiranim u tablici 4.2. Izolirana DNA je prebačena u ploče od 96 uzoraka (slika 4.6) u kojima je izvršena amplifikacija (slika 4.7), koristeći Eppendorf Mastercycler Gradient S instrument (slika 4.8), u uvjetima prikazanim u tablici 4.3.



Slika 4.6 *Prijenos izolirane DNA pipetom*



Slika 4.7 *Ploča sa 96 bazena za uzorke*

Tablica 4.2 *PCR mješavina za amp HV1 regije*

Rnase free water	**5,5 µL**
5x taq mastermix High Yield	**7,5 µL**
Početnica F (20 pmol)	**1,0 µL**
Početnica R (20 pmol)	**1,0 µL**
DNA uzorak (1:10)	**5,0 µL**
Ukupni volumen	**20 µL**

Tablica 4.3 *Uvjeti amp. HV1 regije*

94 C	2 min	
94 C	**30 sek**	
53 C	**45 sek**	**35 cikl**
72 C	**1, 30 min**	
72 C	2 min	
4 C	∞	



Slika 4.8 *Instrument Eppendorf EP Gradient S PCR*

4.5 Detekcija amplifikata na elektroforeznom gelu

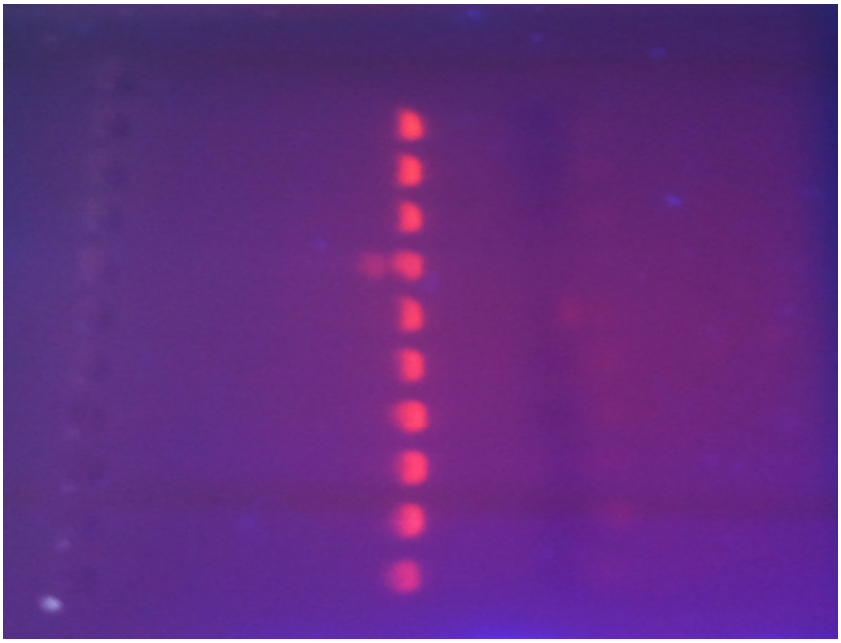
Prisutnost amplifikata je dokazana elektroforezom na 2% agaroznom gelu, na način da je pomiješano 5µL PCR produkta i 5µL Native Sample buffer (BIO-RAD) (slika 4.9), i ostavljeno u aparatu za elektroforezu (slika 4.10) 45 min. na 150 A. Prisutnost amplifikata je dokazana vizualno uz pomoć transluminatora (slika 4.11).



Slika 4.9 *Pufer za iluminaciju uzoraka*



Slika 4.10 *Baterija i kupelj za EF*



Slika 4.11 *Amplifikati pod transluminatorom*

Amplificirana DNA je purificirana korištenjem ExoSAp –IT (Affymetrix Inc, Cleveland OH), po protokolu i zapreminama opisanim u tablici 4.4 i 4.5. Purifikacija je rađena uz pomoć Eppendorf Mastercycler Gradient S instrumenta.

Tablica 4.4 *Mješavina purifikacije*

PCR produkt	**5 µL**
EXO Sap	**2 µL**
Ukupni volumen	**7 µL**

Tablica 4.5 *Temperaturni uvjeti purifikacije*

37C	30min
85C	15min
4C	∞

4.6 Sekvenciranje PCR produkata

Priprema za sekvenciranje PCR produkata je izvršena koristeći se BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kitom (Applied Biosystems) uz dodatak 5x BigDye sekvencijskog pufera (slika 4.12) . Sekvenciranje je izvršeno i s prednjom, i zadnjom početnicom korištenima u amplifikaciji. Mješavina za sekvencijski PCR je opisana u tablici 4.6, dok su u tablici 4.7 navedeni temperaturni uvjeti PCR-a. Sekvencijski PCR je napravljen u tablama kapaciteta 96 uzoraka, koristeći Eppendorf Mastercycler Gradient S instrument.

Tablica 4.6
Sekvencijska mješavina

Big Dye Terminator mastermix	**2,0 µL**
5x Sequencing buffer	**1,0 µL**
Početnica F (10 pmol)	**1,0 µL**
Rnase free H20	**3,0 µL**
PCR produkt	**3,0 µL**
Ukupni volumen	**10,0 µL**

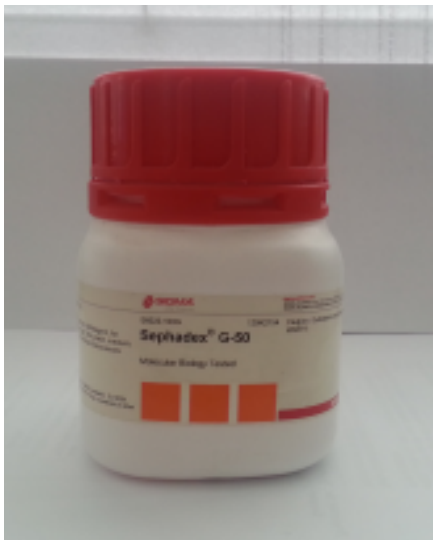
Tablica 4.7
Uvjeti amplifikacije za sekvenciranje

95C	10 min
95C	**10 sec**
55C	**10 sec 35 ciklusa**
60C	**2 min**
4C	∞



Slika 4.12 *Reagensi iz Big Dye Terminator SC kita, kao i korišteni 5x sekvencioni pufer*

Nakon završenog sekvencionog PCR-a, uzorci su pročišćeni dodavanjem Saphadex-a G - 50 (Sigma Aldrich) (slika 4.13) i propuštanjem kroz filtriranu kolumnu (slika 4.14). Otopina Saphadex-a za pročišćavanje je pripremljena tako da je izvagano 1gr Saphadex G – 50 koji je stavljen u tubu od 50 ml. Dodano je 11,0 ml visoko pročišćene vode i inkubirano na sobnoj temperaturi. Nakon toga, 800 ul ove otopine je dodano u Nucleoseq kolumne i centrifugirano na 2.600 okretaja u minuti u trajanju od 2 minute. Potom je zamijenjena kolekcijska tubica, stavljena čista od 1,5 ml, i dodan je cjelokupan PCR produkt u samo središte kolumne. Sve je potom centrifugirano 2 minute na 4800 okretaja u minuti. Dobiveni produkt je spreman za strojno sekvenciranje.



Slika 4.13 *Kemikalija Saphadex*



Slika 4.14 *Spin- kolekcijska tubica*

Uzorci su pripremljeni za sekvenciranje. Sekvenciranje je izvršeno na aparatu ABI 3130 Genetic Analyzer (slika 4.15), koristeći se POP 7 polimerom, i 36 cm kapilarama. Postavke sekvencera su napravljene prema preporukama proizvođača **(100).**



Slika 4.15 *Instrument ABI 3130 Genetic analyzer*

4.7. Kreiranje početnica za jednobaznu ekstenziju

Nakon provedene analize dobivenih sekvenci i utvrđivanja mjesta žarišta signifikantnih SNP-ova unutar obrađene sekvence, pristupljeno je kreiranju odgovarajućih početnica za identifikaciju istih. Izdvojeno je 15 različitih SNP-ova iz HV-1 regije, prema analizi dobivenih sekvenci. Početnice za jednobaznu ekstenziju su kreirane između 16 i 27 bp uzvodno od označenog SNP-a, pri čemu se vodilo računa da ukupna temperatura topljena u PCR-u bude oko 50 deg C. **(73).** Deset od 5 promatranih SNP-ova su opisani u literaturi, i sekvence početnica specifičnih za te SNP-ove su preuzete od Vallone et al. **(97).** Za preostalih pet pronađenih SNP-ova nisu pronađene reference, pa su za njih kreirane nove početnice imajući u vidu spomenute parametre. Komplementarnost novostvorenih početnica s onima preuzetim iz literature, kao i komplementarnost između njih samih je evaluirana

koristeći se Primer Express računalnim programom. Tablica 4.8 sadrži imena početnica, mjesta SNP-ova, sekvence početnica, orijentaciju početnica, kao i podatak o njihovoj prisutnosti u dostupnoj literaturi, ili podatak da su novostvorene za potrebe ovog istraživanja.

Tablica 4.8 *Imena i sekvence početnica*

Ime početnice	**Sekvenca početnice**	**Mjesto SNP-a (HV 1)**	**F/R**	**Prisutnost u literaturi**
Mt16126t	Ccagccaccatgaatattg	103	F	Da
Mt16129b	Caggtggtcaagtatttatggtac	106	R	Da
Mt16172b	Gggggttttgatgtgg	149	R	Da
Mt16189b	Acttgcttgtaagcatgggg	166	R	Da
Mt16223t	Gcaagtacagcaatcaacc	200	F	Da
Mt16224b	Gcagttgatgtgtgatagttg	201	R	Da
Mt16261t	Caactccaaagccacc	238	F	Da
Mt16294b	ggctttatgtactatgtactgttaagg	271	R	Da
Mt16304b	Gtaaatggctttatgtactatgt	281	R	Da
Mt16311b	ctatgtacggtaaatggctttatgt	288	R	Da
RrevB125	gattgggtttttatgtactacaggt	125	R	Ne
RforB70	ccatcaacaaccgctatgtat	70	F	Ne
RrevB70	tggctggcagtaatgtacga	70	R	Ne
RforB233	acatcaactgcaactccaaag	233	F	Ne
RforB46	ggtaccacccaagtattgact	46	F	Ne

Početnice sekvenci navedenih u tablici 4.8 su naručene i sintetizirane od strane Invitrogen, Life Technologies. Početnice su isporučene u liofiliziranom stanju, od kojih je napravljena inicijalna otopina od 500 pmol/μL. Tehničke specifikacije svih početnica se mogu naći u Dodatku 1.

Funkcija navedenih početnica je ispitana tako što su izvedene pojedinačne PCR reakcije s prednjim početnicama (Mt16126t, Mt16223t, Mt16261t, RforB70, RforB70 i RforB46) s početnicom R16410, odnosno zadnjim početnicama

(Mt16129b, Mt16172b, Mt16189b, Mt16224b, Mt16294b, Mt16304b, Mt16311b, RrevB125, RrevB70) s početnicom F15971. Sadržaj mješavine za PCR za prednje i zadnje početnice je naveden u tablicama 4.9 i 4.10, a uvjeti provođenja PCR reakcije su navedeni u tablici 4.11.

Tablica 4.9 *Mješavina amp. prednjih početnica*

Rnase free water	5,5 µL
5x taq mastermix High Yield	7,5 µL
Početnica F (20 pmol)	1,0 µL
Početnica R16410(20 pmol)	1,0 µL
DNA uzorak (1:10)	5,0 µL
Ukupni volumen	20 µL

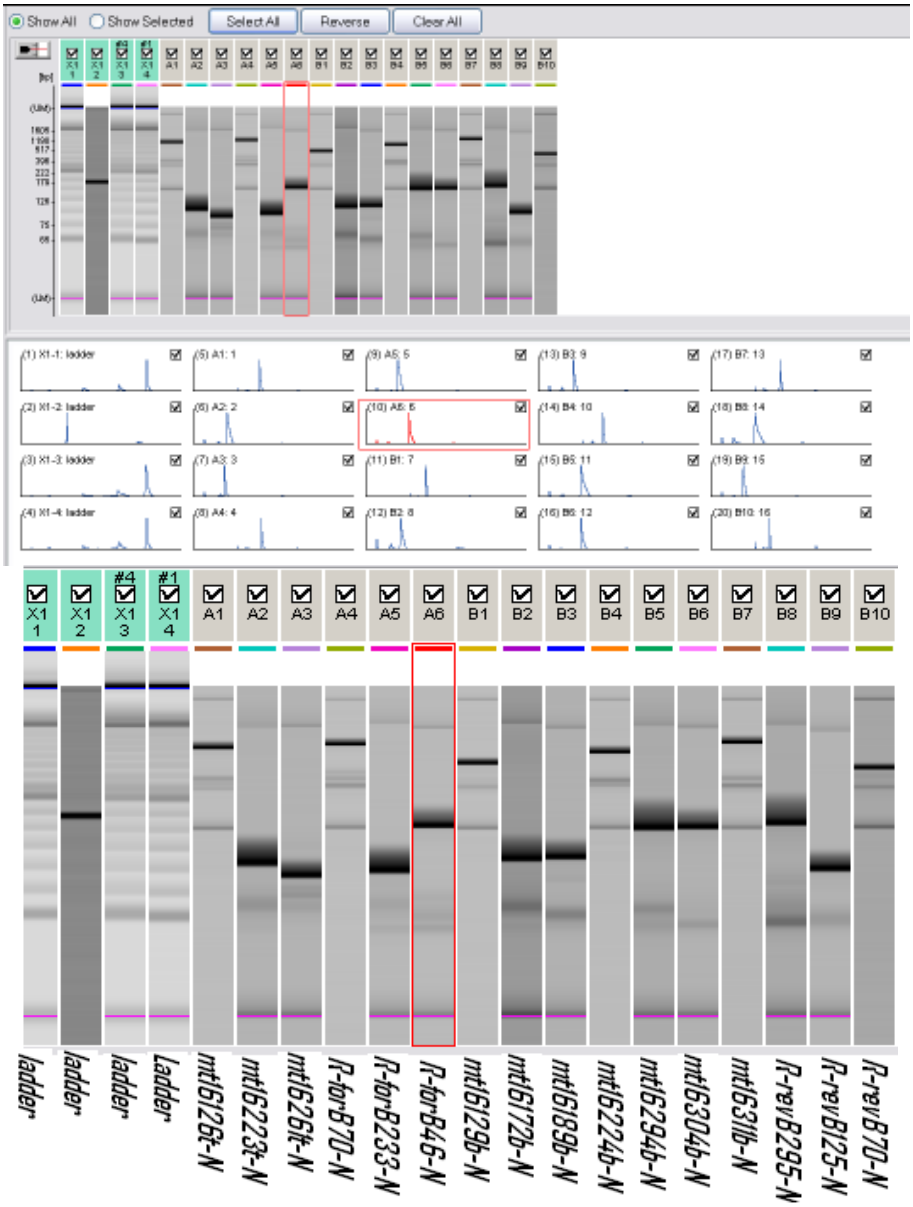
Tablica 4.10 *Mjesavina amp. zadnjih početnica*

Rnase free water	5,5 µL
5x taq mastermix High Yield	7,5 µL
Početnica F15971 (10 pmol)	1,0 µL
Početnica R (10 pmol)	1,0 µL
DNA uzorak (1:10)	5,0 µL
Ukupni volumen	20 µL

Tablica 4.11 *Uvjeti amplifikacije za opisane mješavine*

94C	92 min
94C	**30 sek**
50C	**45 sek 35 ciklusa**
72C	**1:30 min**
4C	∞

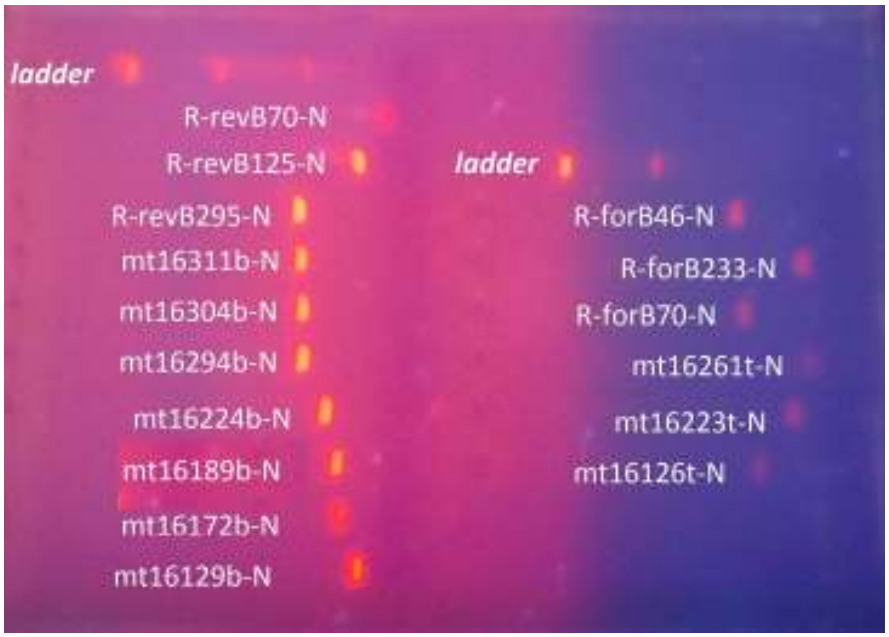
Rezultati amplifikacije su provjereni na elektroforeznom gelu, kao i na Shimadzu MultiNA Electrophoresis sustavu (slike 4.16, 4.17 i 4.18). Dobiveni fragmenti su bili vidljivi i veličine u skladu sa korištenim početnicama.



Slika 4.16 A i B *Veličina amplificiranih fragmenata na Shimadzu MultiNA*



Slika 4.17 *Instrument Shimadzu MultiNa*



Slika 4.18 *Veličina amplificiranih fragmenata na gelu*

Jednobazna ekstenzija je izvršena sa svim početnicama navedenim u tablici 4.8 u pojedinačnim reakcijama, koristeći se ABI SnaPShot kemijom (slika 4.19). **(101)** Kao uzorak je korištena već amplificirana DNA HV-1 regije, pripremljena kao u tablici 4.2, i pročišćena propuštanjem kroz mini-kolumnu. Svaki od uzoraka iz populacijske studije je amplificiran pojedinačno s 15 različitih početnica za

jednobaznu ekstenziju. S obzirom da su početnice RforB70 i RrevB70 stvorene za detekciju istog SNP-a u probnim testiranjima radile jednako dobro, testiranje na ovom SNP-u je izvršeno samo s RforB70 početnicom.



Slika 4.19 *Reagensi sadržani u ABI SNaPShot kitu*

Od inicijalne otopine svake od početnica napravljeni su alikvoti radne otopine od 100 pmol/µL. Sve početnice su dalje otopljene na 1 pmol/µL, koncentracija koja je korištena u reakciji. Mješavina za jednobaznu ekstenziju sa svim početnicama je navedena u tablici 4.12, dok su uvjeti provođenja PCR-a navedeni u tablici 4.13.

Tablica 4.12

Mješavina za jednobaznu ekstenziju

SNaPShot RRM	**5 µL**
SBE početnica (1 pmol)	**1,0 µL**
PCR produkt	**6,0 µL**
Ukupni volumen	**12 µL**

Tablica 4.13

Uvjeti amplifikacije za jednobaznu eks.

96C	**10 sek**
50C	**5 sek 25 ciklusa**
60C	**30 sek**
4C	∞

Po završetku PCR-a za jednobaznu ekstenziju, produkti su pročišćeni koristeći se Exo-Sap IT, Affymetrix Co, po tablici 4.13, u uvjetima navedenim u tablici 4.14.

Tablica 4.13 *Mješavina Exo Sap purifikacije*

Produkt amp	**12 µL**
Exo-Sap	**1,0 µL**
Ukupni volumen	**13 µL**

Tablica 4.14 *Temp. uvjeti*

37C	**60 min**
75C	**15 min**
4C	**∞**

Uzorci su pripremljeni za fragmentarnu analizu po tablici 4.15. Fragmentarna analiza jednobazne ekstenzije je izvršena na 3130 ABI Genetic Analyzer-u, na kojem je prethodno stvorena matrica E5 pomoću ABI *DS-02 DYE SET E5 matrix standards.* Sama fragmentarna analiza je odrađena koristeći se POP 4 polimerom, 36 cm kapilarama, i SNP36_POP4 modulom.

Tablica 4.15 *Detekcijska mješavina*

Hi Di formamide	**9 µL**
Liz 120	**0,5 µL**
PCR produkt	**0,5 µL**
Ukupni volumen	**10 µL**

Obrada rezultata je izvršena pomoću *GeneMapper ID v3.2*, koristeći se postavkama iz tablice 4.16.

Tablica 4.16 *Parametri detekcije na instrumentu ABI Prism 3130 GA*

Analysis Method	**Panel**	**Size Standard**
SNaPShot Default	None	Liz 120

U svrhu multipleksiranja više početnica u jednu reakciju, nekim početnicama su dodani poliT repovi. Imena početnica, kao i broj dodanih T nukleotida nalaze se u tablici 4.17.

Tablica 4.17 *Veličina poliT repova i početnice kojima su dodati*

Ime početnice	**Sekvenca**
Mt16126tMP	(t)26ccagccaccatgaatattg
Mt16223tMP	(t)11gcaagtacagcaatcaacc
RrevB125MP	(t)15gattgggtttttatgtactacaggt
Mt16189MP	(t)10acttgcttgtaagcatgggg
Mt16224bMP	(t)7gcagttgatgtgtgatagttg
Mt16304bMP	(t)12gtaaatggctttatgtactatgt

Početnice za kvadripleks reakcije su pripremljene na način opisan u tablici 4.18. Pripreme početnica za daljnje multipleksiranje su opisane u tablicama 4.19 i 4.20

Tablica 4.18 *Korištene kvadripleks mješavine za jednobaznu ekstenziju*

Quadriplex 1		Quadriplex 2		Quadriplex 3	
mt16223tMP	1,0µL	Mt16223tMP	1,0µL	mt16223tMP	1,0µL
mt16311b-N	1,0µL	Mt16311b-N	1,0µL	mt16311b-N	1,0µL
R-forB46	1,0µL	R-forB46	1,0µL	R-forB46	1,0µL
mt16126tMP	1,0µL	RrevB125MP	2,0µL	mt16189tMP	1,0µL
Rnase f. w.	96,0µL	Rnase f.w.	95,0µL	Rnase f.w.	96,0µL
Quadriplex 4		Quadriplex 5		Quadriplex 6	
mt16223tMP	1,0µL	mt16223tMP	1,0µL	mt16129b	1,0µL
mt16311b-N	1,0µL	mt16311b-N	1,0µL	mt16172b-N	1,0µL
R-forB46	1,0µL	R-forB46	1,0µL	R-forB70	1,0µL
mt16261tN	1,0µL	mt16294bN	1,0µL	mt16224bMP	1,0µL
Rnase f.w.	96,0µL	Rnase f.w.	96,0µL	Rnase f.w.	96,0µL
Quadriplex 7		Quadriplex 8		Quadriplex 9	
mt16129b	1,0µL	mt16129b	1,0µL	mt16129b	1,0µL
RforB70	1,0µL	mt16304MP	1,0µL	RforB70	1,0µL
RforB233	1,0µL	R-forB70	1,0µL	RforB233	1,0µL
mt16304b	1,0µL	RrevB295	1,0µL	RrevB295	2,0µL
Rnase f.w.	96,0µL	Rnase f.w.	96,0µL	Rnase f.w.	95,0µL

Tablica 4.19 *Kombinacija 8 početnica* **Tablica 4.20** *Kombinacija 7 početnica*

Multiplex 1-1	
R-forB46-N	1,0 µL
mt16126t-MP	1,0 µL
mt16223t-MP	1,0 µL
R-revB125-MP	1,5 µL
mt16189b-MP	1,0 µL
mt16261t-N	1,0 µL
mt16294b-N	1,0 µL
mt16311b-N	1,0 µL
Rnase f.w.	91,5 µL

Multiplex 2-1	
R-forB70-N	1,0 µL
mt16129b-N	1,0 µL
mt16172b-N	1,0 µL
mt16224b-MP	1,0 µL
R-forB233-N	1,0 µL
mt16304b-MP	1,0 µL
R-revB295-N	1,0 µL
Rnase f.w	93,0 µL

Pročišćavanje, jednobazna ekstencija i fragmentarna analiza kvadripleks reakcija i multipleks reakcija je provedena na isti način, i pod istim uvjetima kao i reakcije ekstenzije s pojedinačnim početnicama, osim što je prilikom ekstenzijske PCR reakcije broj ciklusa povećan na 30 (u usporedbi s tablicom 4.13). Analiza rezultata pomoću *GeneMapper ID* računalnog programa je provedena pod istim uvjetima kao i analiza pojedinačnih reakcija.

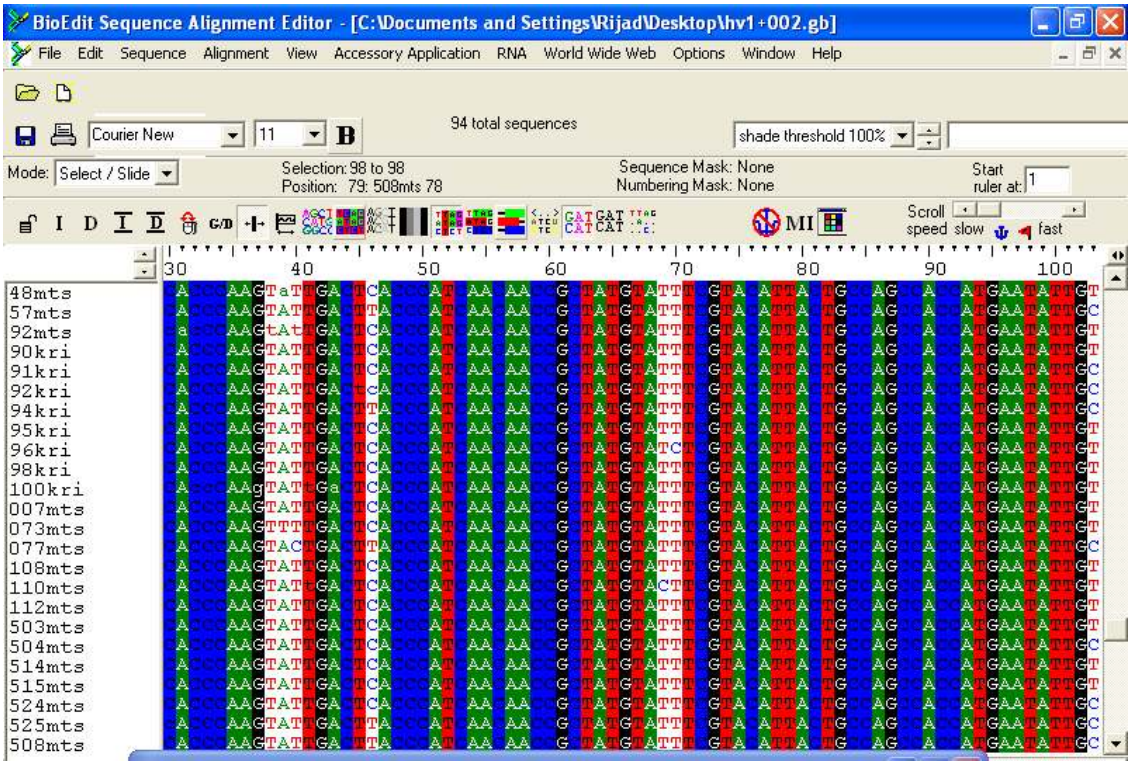
Testiranje jednobaznih reakcija u miješanim uzorcima je napravljeno na način da se je pomiješala ekstrahirana DNA iz uzoraka 016 i 141 u omjerima 1:1, 1:4, i 1:10, u korist uzorka 141. Tako pripremljena DNA je amplificirana na način i pod uvjetima opisanim u tablicama 4.2 i 4.3. Nakon pročišćavanja kroz mini kolumnu, uzorci su podvrgnuti jednobaznoj ekstenziji s početnicama mt16223tMP, mt16311b, RforB46, kao i s kombinacijom početnica opisanom u tablici 4.18, pod nazivom «Kvadriplex 4». Uzorci su pročišćeni na način opisan u tablicama 4.13 i 4.14. Fragmentarna analiza je izvršena na istovjetan način, i pod istim uvjetima kao i za prethodne pojedinačne i multipleks reakcije. Analiza rezultata je izvršena na *GeneMapper ID v3.2* programu, pod istim postavkama kao u tablici 4.16.

5. Rezultati

5.1 Populacijski rezultat i detekcija SNP žarišta

Prosječna količina izolirane DNA iz uzoraka koji su bili predmet istraživanja, determinirana RT kvantifikacijom, iznosila je 3,96 ng/µL. Najmanja detektirana količina iznosila je 546 pg/µL, a najveća 12,8 ng/µL.

Sve dobivene sekvence su inicijalno analizirane u Sequence Detection programu, dok je krajnja analiza elektroferograma izvršena u BioEdit programu (slika 5.1). Pojedinačnim uvidom u svaki od elekroferograma, i njihovom međusobnom usporedbom (slika 5.2), označena su žarišta SNP na HV-1 regiji u obrađenoj populaciji uzoraka.



Slika 5.1 *Sekvence u BioEdit programu*

Izabrano je petnaest (15) žarišta, od kojih je deset (10) opisano u relevantnoj literaturi. Detaljan prikaz zastupljenosti inačica svih SNP-ova je prikazan u Tablici 5.1. Od 300 procesuiranih uzoraka, 294 je dalo čitljive sekvence, na četiri brisa su se razvile gljivične kolonije nakon uzimanja, dok izolacije iz preostala dva brisa nisu pokazale prisutnost DNA.



Slika 5.2 *Sekvence HV-1 regija profiliranih uzoraka. Označena su mjesta HV1 103 (16126), HV1 106 (16129) i HV1 125 (16148). Na žarištu HV1 103 na obje prikazane sekvence primjećuje se prisutnost citozinskog nukleotida (C), što se razlikuje od Andersonove referentne sekvence koja na tom mjestu ima timinski nukleotid. Na žarištu HV1 106 primjećuje se gvaninski nukleotid, što je konzistentno Andersonovoj referentnoj sekvenci. Na žarištu HV1 125, na sekvenci prikazanoj gore se vidi timinski nukleotid, koji se razlikuje od Andersonove referentne sekvence, koja na tom mjestu pokazuje citozinski nukleotid, kao i donja prikazana sekvenca.*

Tablica 5.1 *Prikaz svakog testiranog uzorka pojedinačno na 15 odabranih žarišta, u odnosu na referentnu Andersonovu sekvencu*

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
001						C		T							
002															
003															
004															
005	T		C								T				
006	T		C								T				
007														C	
008														C	
009								T							
010															
011											T			C	
012								T							
013															
014															
015															
016	T		C											C	
017		C												C	
018									C					C	
019															
020		C												C	
021										T					
022														C	
023															
024															
025									C					C	
026															
027															
028	T		C												
029	T		C												
030															
031										T					
032															
033															
034				A	T			T							

Tablica 5.1 (nastavak I) *Prikaz svakog testiranog uzorka pojedinačno na 15 odabranih žarišta, u odnosu na referentnu Andersonovu sekvencu*

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
035															T
036															
037															
038															
039															T
040					T										
041								T							
042				A	T										
043															T
044														C	
045						C	C	T							
046														C	
047				A											
048					T										
049													C		
050									C					C	
051															
052	T		C												
053														C	
054															
055			C									T	C		
056			C									T	C		
057	T		C												
058													C		
059		C													
060															
061													C		
062														C	
063														C	
064	T		C												
065															
066										T				C	
067															
068								T						C	

Tablica 5.1 (nastavak II) *Prikaz svakog testiranog uzorka pojedinačno na 15 odabranih žarišta, u odnosu na referentnu Andersonovu sekvencu*

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
069			C									T			
070				A					C					C	
071									C					C	
072			C				C					T			
073	T		C								T				
074	T		C		T										
075															
076		C													
077															
078				A											
079															
080															
081															
082				A											
083															
084															
085								T							
086															
087	T		C												
088															
089											T				
090															
091														C	
092															
093										T					
094															
095															
096		C													
097															
098														C	
099															
100								T							
101															
102														C	

Tablica 5.1 (nastavak III) *Prikaz svakog testiranog uzorka pojedinačno na 15 odabranih žarišta, u odnosu na referentnu Andersonovu sekvenc*

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
103															
104									C					C	
105			C									T			
106															
107						C		T							
108														C	
109															
110								T							
111		C													
112															
113	T		C												
114															
115								T						C	
116													C		
117															
118															
119								T							
120				A											
121															
122														C	
123			C									T	C		
124															
125		C												C	
126															
127														C	
128															
129															
130	T		C								T				
131															
132		C													
133						C	C	T							
134															
135	T		C												
136															

Tablica 5.1 (nastavak IV) *Prikaz svakog testiranog uzorka pojedinačno na 15 odabranih žarišta, u odnosu na referentnu Andersonovu sekvencu*

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
137														C	
138								T							
139					T										
140	T		C											C	
141						C									
142													C		
143														C	
144				A					C					C	
145										T					
146															
147										T				C	
148															
149	T		C								T				
150															
151	T		C												
152															T
153											T				
154									C					C	
155			C									T			
156			C									T	C		
157															
158						C		T							
159		C													
160															T
161			C				C					T			
162					T										
163								T							
164	T		C								T				
165				A											
166															
167										T					
168														C	
169													C		
170	T		C												

Tablica 5.1 (nastavak V) *Prikaz svakog testiranog uzorka pojedinačno na 15 odabranih žarišta, u odnosu na referentnu Andersonovu sekvencu*

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
171														C	
172	T		C												
173															
174															
175								T						C	
176															
177	T		C								T				
178															
179											T				
180															
181															
182														C	
183		C												C	
184															
185														C	
186					T										
187									C					C	
188															
189	T		C								T				
190															
191										T					
192															T
193															
194								T							
195															
196															
197									C					C	
198													C		
199															
200								T							
201															
202	T		C											C	
203															
204														C	

Tablica 5.1 (nastavak VI) *Prikaz svakog testiranog uzorka pojedinačno na 15 odabranih žarišta, u odnosu na referentnu Andersonovu sekvencu*

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
205									C					C	
206				A											
207				A	T			T							
208	T														
209														C	
210				A	T										
211															
212													C		
213															
214	T		C								T				
215															
216											T				
217			C									T	C		
218															
219		C												C	
220													C		
221	T		C		T										
222															T
223								T							
224			C									T			
225															
226										T					
227				A					C					C	
228	T		C												
229															
230								T							
231	T		C								T				
232															T
233															
234	T		C								T				
235															
236			C				C					T			
237															
238														C	

Tablica 5.1 (nastavak VII) *Prikaz svakog testiranog uzorka pojedinačno na 15 odabranih žarišta, u odnosu na referentnu Andersonovu sekvencu*

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
239										T					
240		C													
241															
242											T			C	
243															
244															
245	T		C												
246						C									
247												T			
248					T										
249														C	
250				A											
251															
252									C					C	
253															
254				A	T										
255								T							
256															
257															
258	T		C												
259															
260														C	
261															
262		C												C	
263															
264														C	
265													C		
266													C		
267	T		C												
268															
269									C					C	
270															
271										T					
272															T

Tablica 5.1 (nastavak VIII) *Prikaz svakog testiranog uzorka pojedinačno na 15 odabranih žarišta, u odnosu na referentnu Andersonovu sekvencu*

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
273													C		
274										T					
275	T		C												
276				A											
277														C	
278				A	T			T							
279															T
280	T		C		T										
281											T			C	
282					T										
283										T				C	
284						C	C	T							
285	T														
286										T					
287	T		C												
288				A											
289														C	
290													C		
291	T		C												
292									C					C	
293															
294													C		

Legenda:

Polje	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Pozicija na mt genomu	16089	16113	16126	16129	16148	16172	16189	16223
Pozicija na HV1	46	70	103	106	125	149	166	200
Anderson	C	T	T	G	C	T	T	C

Polje	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
Pozicija na mt genomu	16224	16256	16261	16294	16304	16311	16318
Pozicija na HV1	201	233	238	271	281	288	295
Anderson	T	C	C	C	T	T	A

U tablici 5.2 prikazane su inačice i zastupljenost u postocima na 15 izabranih SNP-ova.

Tablica 5.2 *Pozicije, inačice i zastupljenost detektiranih polimorfizama*

Pozicija na genomu	***Inačica po Andersonu***	***Alternativna inačica SNP-a***	***Zastupljenost alternativne inačice (%)***
16089	C	T	12,58
16113	T	C	4,8
16126	T	C	15,99
16129	G	A	6,12
16148	C	T	5,44
16172	T	C	2,72
16189	T	C	2,04
16223	C	T	8,84
16224	T	C	5,10
16256	C	T	4,76
16261	C	T	6,12
16294	C	T	4,42
16304	T	C	6,46
16311	T	C	20,75
16318	A	T	3,40

Među obrađenim sekvencama izdvojena su 33 (trideset tri) tipa mtDNA. Tablica 5.3 prikazuje sve zabilježene tipove mtDNA, odnosno unikatne kombinacije inačica SNP-ova na svih 15 odabranih lokusa.

Tablica 5.3 *Prikaz detektiranih tipova mtDNA i njihove zastupljenosti*

Tip	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	#/294	%	GGIP	LR
1.	c	t	t	g	c	t	t	c	t	c	c	c	t	t	a	96	32,65	0,37	3,06
2.	c	t	t	g	c	c	t	t	t	c	c	c	t	t	a	3	1,02	0,021	98,04
3.	t	t	c	g	c	t	t	c	t	c	t	c	t	t	a	9	3,06	0,05	32,68
4.	c	t	t	g	c	t	t	c	t	c	c	c	t	c	a	28	9,52	0,128	10,50
5.	c	t	t	g	c	t	t	t	t	c	c	c	t	t	a	14	4,76	0,072	21,00
6.	c	t	t	g	c	t	t	c	t	c	t	c	t	c	a	3	1,02	0,021	98,04
7.	t	t	c	g	c	t	t	c	t	c	c	c	t	c	a	3	1,02	0,021	98,04
8.	c	c	t	g	c	t	t	c	t	c	c	c	t	c	a	3	1,02	0,021	98,04
9.	c	t	t	g	c	t	t	c	c	c	c	c	t	c	a	12	4,08	0,063	24,51
10.	c	c	t	g	c	t	t	c	c	c	c	c	t	c	a	3	1,02	0,021	98,04
11.	c	t	t	g	c	t	t	c	t	t	c	c	t	t	a	10	3,40	0,054	29,41
12.	t	t	c	g	c	t	t	c	t	c	c	c	t	t	a	18	6,12	0,089	16,34
13.	c	t	t	a	t	t	t	t	t	c	c	c	t	t	a	3	1,02	0,021	98,04
14.	c	t	t	g	c	t	t	c	t	c	c	c	t	t	t	10	3,40	0,054	29,41
15.	c	t	t	g	t	t	t	c	t	c	c	c	t	t	a	7	2,38	0,041	42,02
16.	c	t	t	a	t	t	t	c	t	c	c	c	t	t	a	3	1,02	0,021	98,04
17.	c	t	t	g	c	c	c	t	t	c	c	c	t	t	a	3	1,02	0,021	98,04
18.	c	t	t	a	c	t	t	c	t	c	c	c	t	t	a	9	3,06	0,05	32,68
19.	c	t	t	g	c	t	t	c	t	c	c	c	c	t	a	14	4,76	0,072	21,00
20.	c	t	c	g	c	t	t	c	t	c	c	t	c	t	a	6	2,04	0,038	49,02
21.	c	c	t	g	c	t	t	c	t	c	c	c	t	t	a	4	1,36	0,027	73,53
22.	c	t	t	g	c	t	t	c	t	t	c	c	t	c	a	3	1,02	0,021	98,04
.23.	c	t	t	g	c	t	t	t	t	c	c	c	t	c	a	3	1,02	0,021	98,04
24.	c	t	c	g	c	t	t	c	t	c	c	t	t	t	a	4	1,36	0,027	73,53
25.	c	t	t	a	c	t	t	c	c	c	c	c	t	c	a	3	1,02	0,021	98,04
26.	c	t	c	g	c	t	c	c	t	c	c	t	t	t	a	3	1,02	0,021	98,04
27.	t	t	c	g	t	t	t	c	t	c	c	c	t	t	a	3	1,02	0,021	98,04
28.	c	t	t	g	c	t	t	c	t	c	t	c	t	t	a	4	1,36	0,027	73,53
29.	t	t	t	g	c	t	t	c	t	c	c	c	t	t	a	2	0,68	0,016	147,06
30.	c	t	t	g	c	c	t	c	t	c	c	c	t	t	a	1	0,34	0,01	294,12
31.	c	t	t	g	c	t	t	c	t	c	c	t	t	t	a	1	0,34	0,01	294,12
32.	c	t	t	g	c	c	t	c	t	c	c	c	t	t	a	1	0,34	0,01	294,12
33.	t	t	c	g	t	t	t	c	t	c	c	c	t	t	a	1	0,34	0,01	294,12

Vrijednost GGIP (Gornja Granica Intervala pouzdanosti, eng *Upper Level Confidence Interval)* za pojedini profil koji se primjećuje određeni broj puta unutar testirane populacije se izračunava na sljedeći način **(4,102)**:

$$GGIP = p + 1.96* \text{sqrt}((p)*(1 - p)/N)$$

gdje "p" predstavlja frekvenciju pojavljivanja određenog tipa, i jednak je broju primijećenih profila / ukupan broj profila (N). U ovom slučaju, N = 294.

Na primjer:
U testiranoj populaciji uzoraka (N = 294) tip 5 mtDNA je primijećen 14 puta. Vrijednost p za tip 5 je 14/294, i iznosi 0,0476. GGIP je izračunat na sljedeći način:

0,0476 + 1,96*sqrt((0.0476)*(1 – 0,0476)/294)
i iznosi 0,072 ili 7,2%

Izračunate GGIP vrijednosti za svaki od trideset tri primijećena tipa mtDNA u populaciji je izračunat na ovaj način i upisan u tablici 4.3. Njihove vrijednosti u postotcima su dobivene množenjem sa 100.

Zbog linearne prirode nasljeđivanja mtDNA, LR je jednak inverznoj vrijednosti "p".

$$LR = 1/p$$

Na primjer:
Tip 12 mtDNA p = 0,0612

$$LR(\text{tip } 12) = 1/0{,}0612 = 16{,}34$$

5.2 Rezultati analize jednobaznom ekstenzijom

Nakon analize elektroferograma jediničnih reakcija jednobazne ekstenzije (reakcije sa samo jednom početnicom), utvrđeno je potpuno poklapanje rezultata dobivenih klasičnim sekvenciranjem po Sangeru (opisanih u tablici 5.1), i rezultata dobivenih reakcijama jednobazne ekstenzije (slika 5.3). Veličine i boje svih fragmenata na elektroferogramima dobivenih jednobaznom ekstenzijom s pojedinačnim početnicama su prikazane u tablici 5.5.

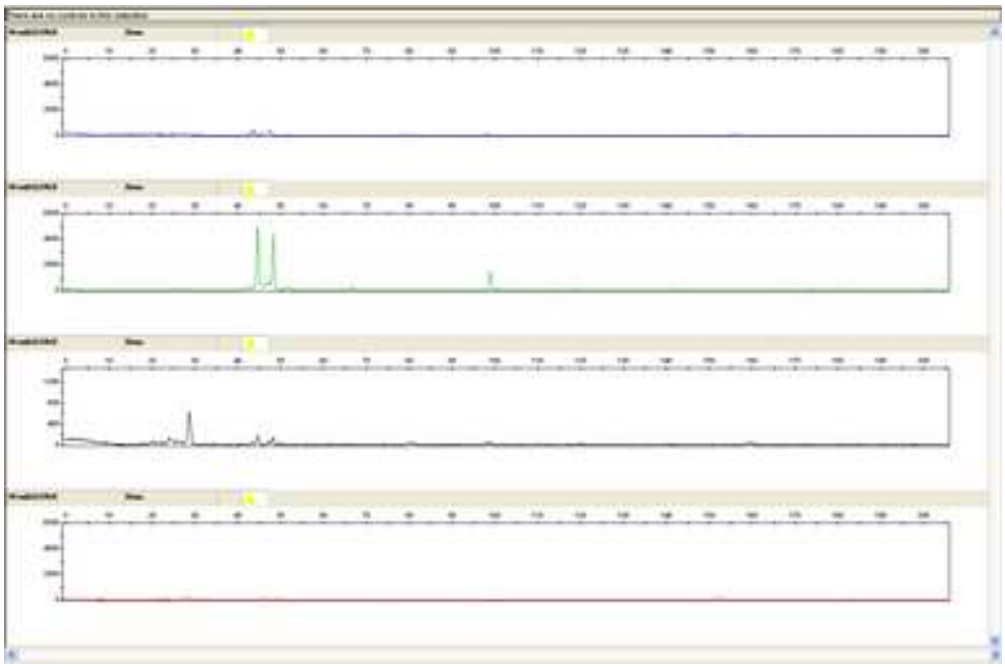
Tablica 5.5 *Imena početnica, veličina fragmenata i boja signala*

Lokus	**Početnica**	**Veličina fragmenta u bp (vel. početnice +1)**	**Veličina fragmenta na elektroferogramu (bp)**	**Boja signala (Anderson)**	**Boja signala (alternativni SNP)**
16089	RforB46	22	26	Crna (C)	Crvena (T)
16113	RforB70	22	27	Crvena (T)	Crna (C)
16126	Mt16126tMP	46	50	Crvena (T)	Crna (C)
16129	Mt16129b	25	29	Crna (C)	Crvena (T)
16148	RrevB125MP	41	44	Plava (G)	Zelena (A)
16172	Mt16172b	17	20	Zelena (A)	Plava (G)
16189	Mt16189bMP	31	37	Zelena(A)	Plava (G)
16223	Mt16223tMP	31	33	Crna (C)	Crvena (T)
16224	Mt16224bMP	29	32	Zelena (A)	Plava (G)
16256	RforB233	22	25	Crna (C)	Crvena (T)
16261	Mt16261t	17	22	Crna (C)	Crvena (T)
16294	Mt16294b	28	32	Plava (G)	Zelena (A)
16304	Mt16304bMP	33	38	Zelena (A)	Plava (G)
16311	Mt16311b	26	30	Zelena (A)	Plava (G)
16318	RrevB295	25	31	Crvena (T)	Zelena (A)



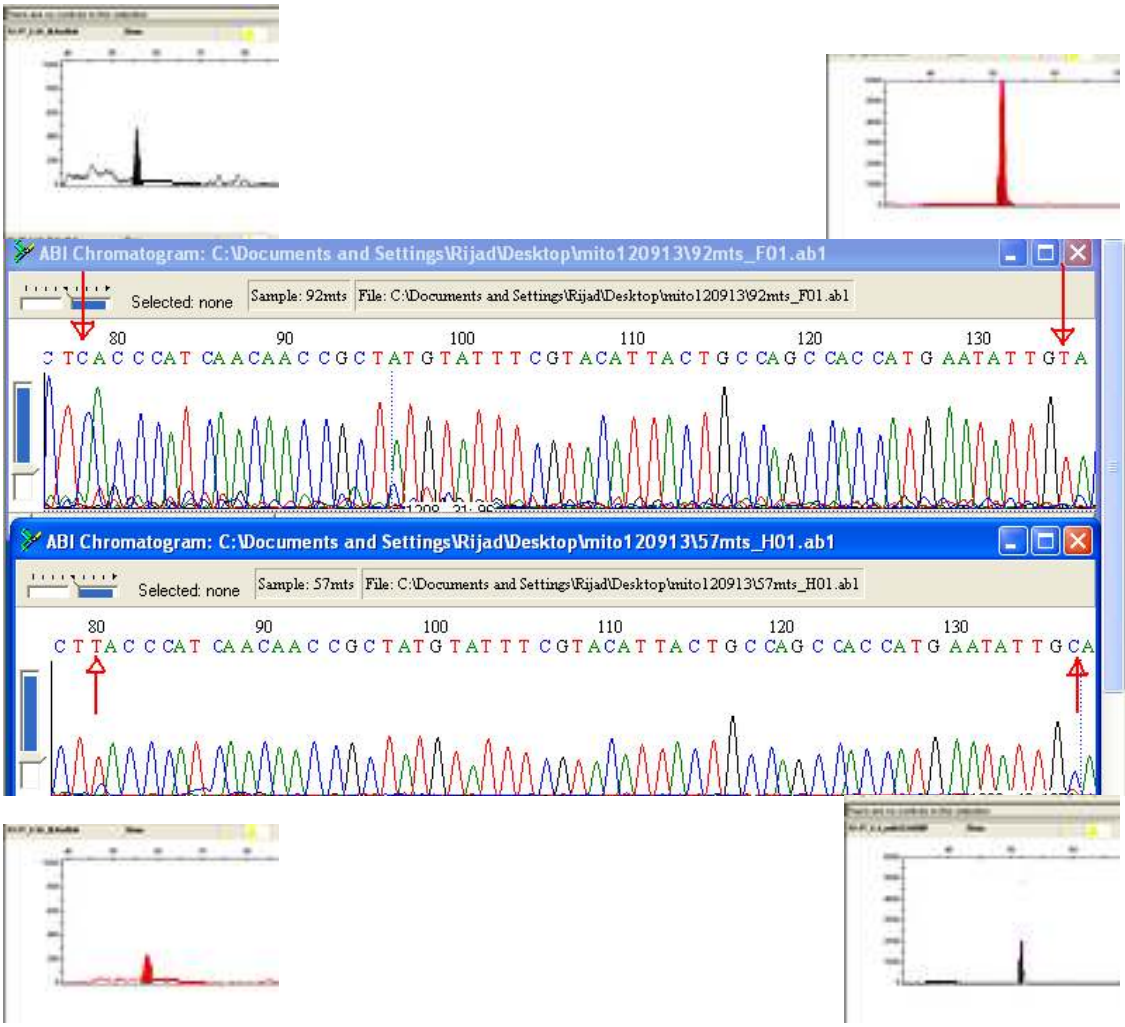
Slika 5.3 *Prikaz odnosa elektroferograma. Slika pokazuje elektroferograme reakcije jednobazne ekstenzije na žarištima 16089 i 16113. Elektroferogram prikazan iznad sekvence pokazuje crni signal za fragment veličine 26 bp, postignut jednobaznom ekstenzijom pomoću početnice RforB46. Signal potvrđuje prisutnost citozinskog nukleotida na lokusu 16089, što se poklapa s rezultatima sekvenciranja. Elektroferogram reakcije jednobazne ekstenzije prikazan ispod sekvence pokazuje crveni signal za fragment veličine 27 bp, postignut jednobaznom ekstenzijom pomoću početnice RforB70. Signal potvrđuje prisutnost timinskog nukleotida na lokusu 16113, što se poklapa s rezultatima sekvenciranja.*

Ukupno je napravljeno 4.410 pojedinačnih reakcija jednobazne ekstenzije (294 uzorka x 15 početnica kreiranih za detekciju izabranih SNP-ova). Na 3.660 profila uočeni su nespecifični signali u zelenoj boji, koji bi odgovarali fragmentima od 45 bp, 48 bp i 66 bp. Svi navedeni nespecifični signali se morfološki lako razlikuju od stvarnih fragmenata dobivenih jednobaznom ekstenzijom. Svojom lokacijom, prvi od uočenih nespecifičnih signala je mogao predstavljati problem prilikom interpretacije elektroferograma jednobazne ekstenzije s početnicom RrevB125, i to kada je u pitanju alternativna inačica SNP-a, ali u tim reakcijama opisani nespecifični fragmenti nisu bili prisutni. Nespecifični fragmenti su katalogizirani te nisu smetali interpretaciji rezultata. (slika 5.4). Visina i jačina signala nespecifičnih fragmenata se pokazala obrnuto proporcionalnoj visini i snazi fragmenata koji su produkt jednobazne ekstenzije.



Slika 5.4 *Prikaz nespecifičnih artefakata***.** *Na elektroferogramu reakcija jednobazne ekstenzije početnicom mt16129 vidljivi su nespecifični produkti u zelenoj boji. Analiza uzorka, odnosno crni signal fragmenta od 29 bp koji je direktan proizvod jednobazne ekstenzije navedenom početnicom, je provedena bez poteškoća*.

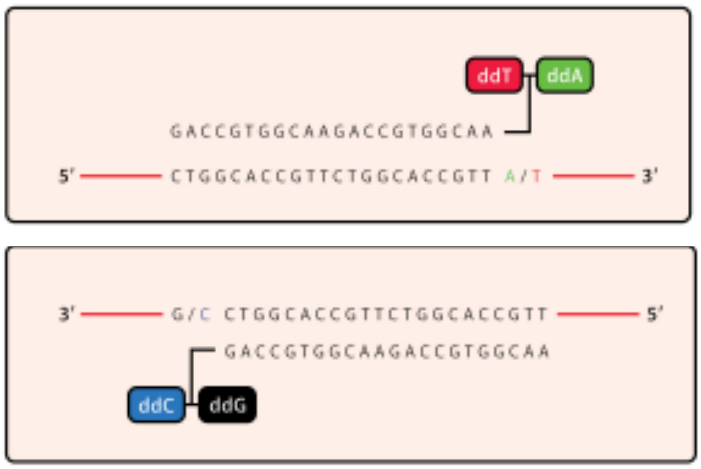
Razlike u sekvencama između uzoraka 057 i 060, i njihova ekspresija u jednobaznoj ekstenziji prikazane su na slici 5.5.



Slika 5.5 *Prikaz razlika u sekvenci između dva uzorka (057 i 060) na SNP žarištima 16089 i 16126, i njihova demonstracija u elektroferogramima reakcija jednobaznih ekstenzija*

Jednobazna ekstenzija početnicama komplementarnim s vodećim lancem DNA, odnosno prednjim početnicama, na elektroferogramima daju signale koji odgovaraju nukleotidima koje vidimo prilikom sekvenciranja. Ove početnice su

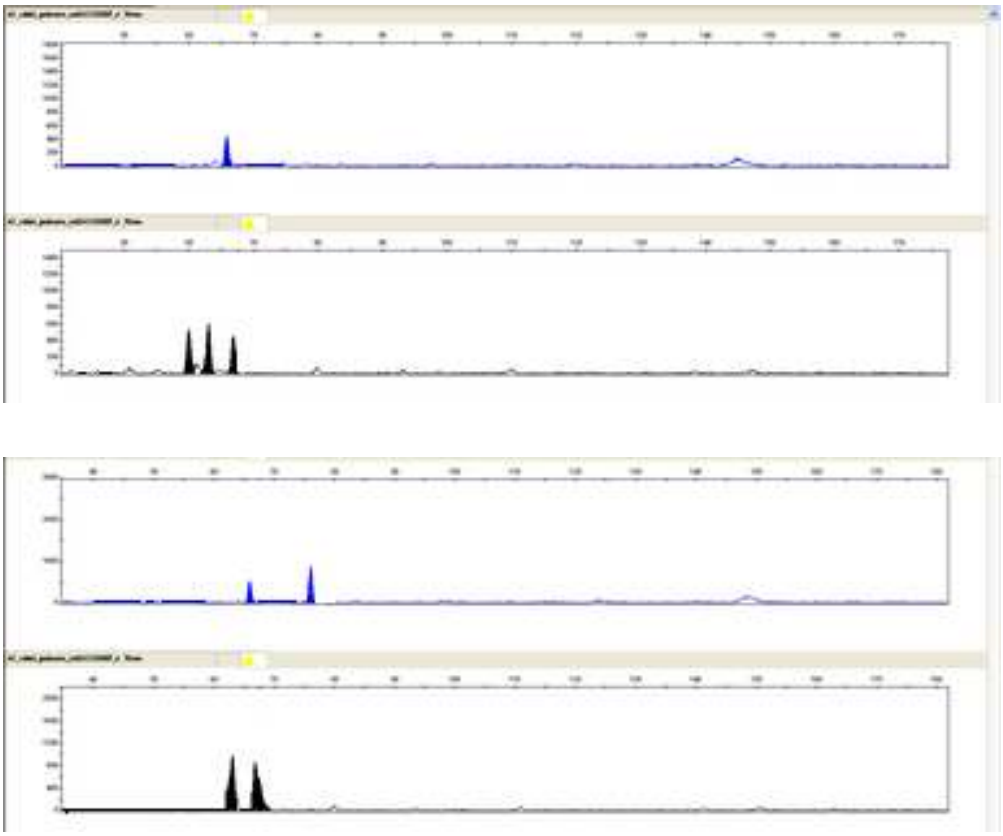
označene s “t” na kraju imena početnice, ili “for” u sredini imena početnice, zavisno da li su početnice preuzete iz literature (npr. Mt16261t), ili su sintetizirane za žarišta karakteristična za ovo istraživanje (npr. RforB46). Reakcije s početnicama koje se vežu s komplementarnim lancem, odnosno zadnjim ili reverznim početnicama, na elektroferogramima jednobazne ekstenzije daju signale koji odgovaraju nukleotidima komplementarnim onima koje vidimo u sekvenci. Ove početnice su označene sa slovom “b” na kraju imena početnice, ili sa kraticom “rev” u sredini imena početnice, na isti način kao i kod prednjih početnica. Tako, na primjer, na SNP žarištu na lokusu 16089, gdje se javlja citozinski ili timinski nukleotid, elektroferogram jednobazne ekstenzije s početnicom RforB46tom daje crni ili crveni signal, što odgovara navedenim nukleotidima. S druge strane, kod jednobazne ekstenzije s početnicom mt16129b koja se veže na komplementarni lanac, na elektroferogramu se vide rezultati koji odgovaraju citozinskom i timinskom nukleotidu, koji su komplementarni gvaninskom i citozinskom nukleotidu, koji su zapravo detektirane inačice SNP-a na lokusu 16129. Slika 5.6 demonstrira prednju i zadnju početnicu za jednobaznu ekstenzuju.



Slika 5.6 *Prikaz prednje (gore) i zadnje (dolje) početnice za jednobaznu ekstenziju za isti SNP*

Rezultati kvadripleks reakcija jednobaznih ekstenzija su pokazali apsolutno podudaranje s jediničnim reakcijama. Nisu uočene razlike u veličini fragmenata, niti

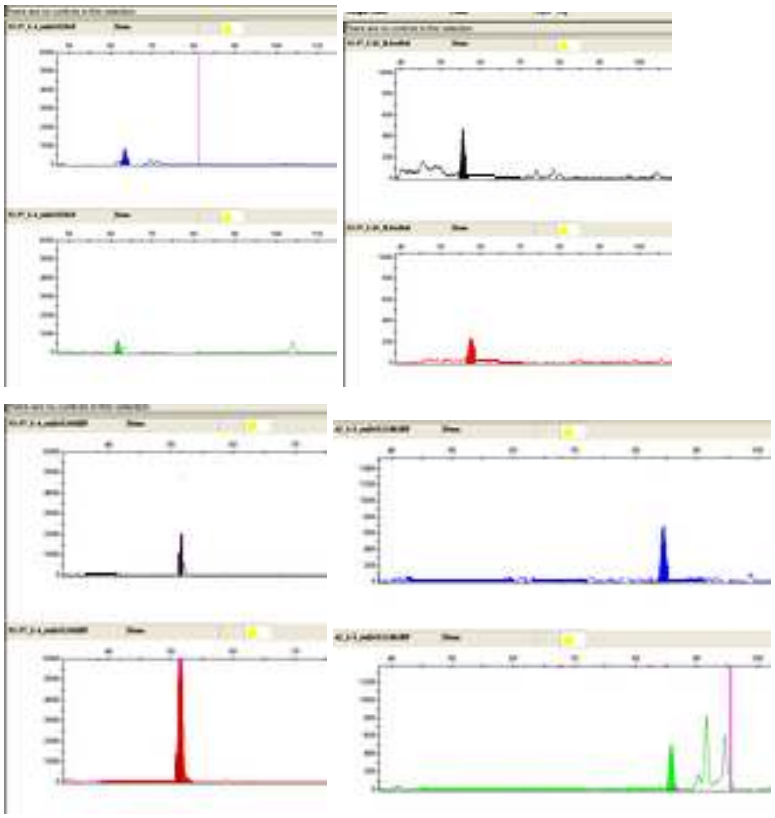
pojave nespecifičnih fragmenata kao posljedica multipleksiranja početnica. Elektroferogrami kvadripleks reakcija jednobaznih ekstenzija su prikazani na slici 5.7.



Slika 5.7 *Prikaz multipleks reakcija jednobazne ekstenzije. Gornji elektroferogram predstavlja kvadripleks reakciju s početnicama Mt16223tMP, Mt16311b, RforB46 i Mt16129b. Elektroferogram ukazuje da se na žarištu 16089 nalazi citozinski nukleotid, na žarištu 16129 nalazi se gvaninski nukleotid (elektroferogram pokazuje komplementarni citozin, jer je korištena zadnja početnica), na žarištu 16223 nalazi se citozinski nukleotid, te se na žarištu 16311 nalazi citozinski nukleotid (elektroferogram pokazuje komplementarni gvanin). Jedino žarište 16311 pokazuje alternativnu inačicu SNP, ostali su komplementarni s Andersonovom sekvencom. Drugi elektroferogram pokazuje kvadripleks reakciju s početnicama Mt16223tMP, MT16311b, RforB46 i RrebB125. Jednobazne ekstenzije s početnicama Mt16223tMP, Mt16311b i RforB46 već su opisane, dok se na žarištu 16148 nalazi citozinski nukleotid, s obzirom da na samom elektroferogramu vidimo komplementarni gvanin, jer se radi o zadnjoj ili reverznoj početnici.*

Analiza svih petnaest žarišta jednobaznom ekstenzijom u dvije reakcije provedena je s kombinacijama od 7 i 8 početnica, složenih između sebe prema veličini fragmenata koje generiraju da bi se izbjegla preklapanja rezultata (kako je opisano u sekciji *Materijali i metode)*. Međutim, u trideset ovako provedenih reakcija pokazao se je gubitak rezultata jedne ili dvije početnice. Zbog toga su učinjene dupleks reakcije svih početnica između sebe, da bi se isključila mogućnost vezanja nekih od početnica između sebe. Sve dupleks reakcije pokazale su jasne rezultate, što znaci da je uspjeh ovakvog testiranja isključivo stvar optimizacije.

Elektroferogrami reakcija jednobazne ekstenzije na pomiješanim uzorcima pokazali su signale na obje inačice SNP-a koje su bile vidljive u sekvencama uzoraka koji su činili mješavinu. Elektroferogrami su prikazani na slici 5.8.



Slika 5.8 *Prikaz elektroferograma miješanih uzoraka. Elektroferogrami pomiješanih uzoraka 016 i 141, u omjeru 1:4. Reakcije jednobazne ekstenzije provedene s početnicama Mt16311b (gornji lijevo), RforB46 (gornji desno), Mt16126tMP (donji lijevo) i 16224bMP (donji desno)*

Iako su miješani uzorci pripremljeni u odnosima 1:1, 1:4 i 1:10, nisu primijećene velike razlike u intenzitetu signala kod slabije zastupljenog uzorka između otopina 1:4 i 1:10. Jednaki odnosi između intenziteta signala su primijećeni i kod reakcija jednobazne ekstenzije na miješanim uzorcima s više početnica odjednom (slika 5.9)



Slika 5.9 *Elektroferogram reakcije jednobazne ekstenzije s kombinacijom 4 početnice (quadriplex 4 mix) na miješanom uzorku*

Sve reakcije jednobazne ekstenzije s kombinacijom početnica pokazale su identične rezultate na testiranim žarištima kao i one s pojedinačnim početnicama.

6. Rasprava

Provođenje ovakve studije prvenstveno ima za cilj unapređenje forenzičke prakse na način koji stvara referentnu vrijednost učestalosti tipova mtDNA, uz pomoć koje se može interpretirati značaj rezultata dobivenih u svakodnevnoj forenzičkoj praksi. Iako se u praksi razlike između bilo kojeg uzorka i referentne sekvence primjećuju i bilježe na velikom broju lokusa, označavanje žarišta na kojima su alternativne inačice SNP-a najčešće ima dvostruku korist: olakšava statističku obradu dobivenih podataka, i omogućava alternativne pristupe njihovom detektiranju.

Provođenje istraživanja ovog tipa dodatno dobiva na važnosti kad se uzme u obzir da su mtDNA profili uvelike specifični od populacije do populacije. U ovom istraživanju izabrano je 15 žarišta SNP-a. Na trinaest od petnaest izabranih žarišta uočena učestalost slabije zastupljene inačice SNP je bila iznad 3%, što je preporučena donja granica kod analize SNP-a **(4).** Na lokusima 16172 i 16189 (HV1 149 i HV1 166) uočene učestalosti alternativne inačice SNP-a bile su 2,72% i 2,04% (u oba slučaja radi se o supstituciji timinskog nukleotida, komplementarnog Anderson referentnoj sekvenci, citozinskim, i one su uočene 8, odnosno 6 puta unutar populacije uzoraka od 294), ali su u istraživanje uvrštene zbog njihove prisutnosti u većini relevantnih istraživanja **(2,38,97)**. Zastupljenost alternativnih inačica na spomenutim žarištima je u ovim referentnim radovima i do 3,5 puta veća nego što je to primijećeno u ovom istraživanju. Svi ostali SNP-ovi koji su odabrani za ovo istraživanje imali su učestalost veću od 3%, a najveća primijećena učestalost alternativne inačice SNP-a je na lokusu 16311 (HV1 103), koja je zabilježena na 61 od 294 testiranih uzorka, odnosno u 20,75 %.

Provedeno istraživanje koncentriralo se je na žarišta SNP-ova locirana na HV-1 regiji. Vallone i dr. na istom segmentu prijavljuju također 15 žarišta, od kojih se deset poklapa s ovim istraživanjem (to su žarišta na lokusima 16126 (HV1 103), 16129 (HV1 106), 16172 (HV1 149), 16189 (HV1 166), 16223 (HV1 200), 16224 (HV1 201), 16261 (HV1 238), 16294 (HV1 271), 16304 (HV1 281), 16311 (HV1

288)**(97)**. Ostalih pet žarišta opisano u studiji Vallone i dr. nalaze se na lokusima 16051 (HV1 28), 16264 (HV1 241), 16278 (HV1 255), 16360 (HV1 337) i 16362 (HV1 339). Zastupljenost alternativnih inačica SNP-a na navedenim lokusima unutar ove studije je bila zanemariva. Na lokusu 16051 (HV1 28), supstitucija citozinskog nukleotida timinskim je u ovom istraživanju zabilježena samo na dva uzorka od testiranih 294. Supstitucija citozina timinom, kao alternativna inačica SNP-a, je zabilježena na lokusima 16264 (HV1 241), 16278 (HV1 255) i 16360 (HV1 337) i kod Vallone i dr., kao i kod Parsons i dr., dok u ovom istraživanju nije zabilježen nijedan takav slučaj ni na jednom od navedenih lokusa.**(38,97)** Također, lokus 16362 (HV1 339) je naveden kao žarište SNP-a u oba istraživanja, dok je u ovom supstitucija citozina timinom na tom lokusu uočena samo jednom.

S druge strane, ovo istraživanje je identificiralo lokuse 16069 (HV1 46), 16093 (HV1 70), 16148 (HV1 125), 16256 (HV1 233), i 16318 (HV1 295) kao žarišta SNP-ova. Nijedan od ovih navedenih lokusa nije spomenut u studiji Vallone i dr., iako zastupljenost alternativnih inačica SNP-ova na ovim lokusima zabilježenih u ovom istraživanju obuhvaća od 3,4 % (10 uzoraka od 294, lokus 16318) do 12,58 % (37 uzoraka od 294, lokus 16069).**(97)** Butler u svojoj knjizi "Forenzičko DNA tipiziranje" navodi lokuse na HV1 regiji s najčešćim primijećenim žarištima SNP-ova, koja uključuju lokus 16093 (HV1 70), ali ne i lokuse 16069 (HV1 46), 16148 (HV1 125), 16256 (HV1 233) i 16318 (HV1 295). **(4)** Tu su i zabilježeni lokusi 16270 (HV1 247), 16309 (HV1 286), 16311 (HV1 288) koji nisu primijećeni kao žarišta u ovom istraživanju. U knjizi nisu navedene učestalosti alternativnih inačica SNP-ova.

Važno je spomenuti da su lokusi 16093 (HV1 70), i 16129 (HV 106), osim što su polimorfični unutar populacije, također žarišta heteroplazmičnosti mtDNA.**(1)** Polimorfizmi unutar mtDNA jedne jedinke nisu bili predmet ovog istraživanja.

Kad govorimo o statističkoj signifikantnosti SNP analize prilikom forenzičke analize, otprilike četiri SNP-a su jednako informativna kao jedan STR marker.**(4)** Ipak, ovakav odnos vrijedi isključivo kada se radi o SNP-ovima koji su locirani na autozomima. Linearno nasljeđivanje mtDNA isključivo po majčinskoj liniji bez rekombinacije znači da su sve pozicije nukleotida naslijeđene zajedno i ovisno jedni

od drugih. Shodno tome, svaka očitovana sekvenca mtDNA mora se tretirati kao jedinični lokus ili haplotip, vrlo slično načinu na koji tretiramo profile dobivene tipizacijom Y kromosoma. Zbog toga, pravilo kombinirane vjerojatnosti, dobivene množenjem vjerojatnosti nezavisnih STR-ova, ili SNP-ova koje se nalaze na različitim autozomima, nije primjenjivo kod mtDNA polimorfizama. **(77)** Prema tome, bilježenje zastupljenosti polimorfizama izražene u postocima na lokusima mtDNA ima čisto informativnu vrijednost, te se ne može koristiti kao osnova izračunavanja značaja podudaranja u forenzičkoj praksi. **(89)**

Uzimajući u obzir navedene specifičnosti nasljeđivanja mtDNA, nije moguće odrediti razlike u diskriminacijskom potencijalu između utvrđenih polimorfizima u ovom istraživanju, i populacijskog istraživanja koja se odnosi na 16 STR lokusa, provedenog unutar iste populacije. **(16)** Očigledan je puno veći diskriminacijski potencijal kod STR markera, što je, uostalom, i osnovna prednost ove vrste forenzičke analize. Cilj ovog i sličnih istraživanja nije pronalaženje alternative STR analizi kao osnovici forenzičkog DNA testiranja danas, nego davanje maksimalnog potencijala mtDNA testiranju unutar odabrane populacije, onda kada testiranje sa STR markerima nije moguće ili prikladno.

Trenutna statistička praksa u utvrđivanju specifičnosti tipa mtDNA unutar populacije nesrodnih pojedinaca podrazumijeva brojanje koliko se puta određena sekvenca ponavlja unutar nje. Ovaj pristup je poznat kao "metoda brojanja", i u potpunosti je ovisan od broja ponavljanja određenog tipa mtDNA unutar populacije, ili baze podataka s kojom se uspoređuje. **(66)** Pojedine referentne studije su predložile izračunavanje vrijednosti LR (*likelihood ratio* eng., omjer vjerojatnosti) za uočene tipove mtDNA. **(1)** Ipak, ponovo uzimajući u obzir specifičnosti nasljeđivanja mtDNA, učestalost pojedinog tipa mtDNA (p) je svedena na broj koliko je puta taj tip primijećen u populaciji, što vrijednost LR svodi na inverznu vrijednost učestalosti tog tipa, odnosno 1/p.

Statistička vrijednost koja se koristi prilikom vrednovanja podudaranja mtDNA je tzv. gornja granica intervala pouzdanosti (GGIP). Izračunavanje gornje granice intervala pouzdanosti pruža procjenu raspona vrijednosti, koji se izračunava iz određenog skupa podataka ili populacije unutar koje je vjerojatno da

se promatrani parametar nalazi. To znači da, koristeći dostupne populacijske podatke, mogu biti određene granice unutar kojih nalazimo pojedine tipove mtDNA, na način na koji je to prikazano na strani 54, u poglavlju Rezultati. Vrijednosti GGIP zavise od zastupljenosti pojedinog tipa mtDNA u populaciji unutar koje ih računamo. Tako, na primjer, možemo usporediti statističku signifikantnost podudaranja određenog tipa mtDNA za populacijske podatke iz ove, i studije provedene od strane Lehocky i dr. na uzorku populacije Slovačke Republike **(103)**. Tip 4 mtDNA, koji karakterizira prisutnost alternativne inačice SNP-a na lokusu 16311, ima vrijednost GGIP unutar populacije obrađene u ovom istraživanju od 0,128 (12,8%), naspram 0,085 (8,5%) unutar populacije obrađene u istraživanju Lehocky i dr. U slučaju da ovakav profil mtDNA bude predmet forenzičkog vještačenja, zaključak bi glasio da bi se unutar 12,8% populacije Bosne i Hercegovine ovakav tip mtDNA mogao naći sasvim slučajno, dok bi ta vrijednost za Republiku Slovačku iznosila 8,5%. Još veća razlika u vrijednostima intervala pouzdanosti se uočava kada se radi o tipu mtDNA koji je prisutan unutar jednog, ali ne i unutar drugog populacijskoga uzorka. Ukoliko bi označeni Tip11 mtDNA iz ovog istraživanja bio predmet vještačenja, njegov GGIP u usporedbi s populacijskim podacima iz studije Lehocky i dr. bi morao biti izračunat koristeći se formulom:

$$GGIP = 1 - \alpha^{1/N}$$

s obzirom da takav profil nije zabilježen u 374 (N) obrađena uzorka. Vrijednost α iznosi 0,05 za 95% interval pouzdanosti. **(4)** Tako izračunata GGIIP za ovaj tip mtDNA iznosi 0,8% za populaciju uzoraka iz Slovačke Republike, naspram 5,4% za uzorke iz BiH, gdje je on primijećen 10 puta u populaciji od 294 uzorka. Treba imati u vidu da su oba kompleta profila uzeta iz populacije slavenskoga podrijetla, te da bi razlike između izračunatih vrijednosti GGIP između baza podataka koje potiču od značajno različitih etničkih skupina varirale mnogo više**,** na isti način kako to vidimo kod vrijednosti LR -a kod izračunavanja signifikantnosti podudaranja korištenjem STR markera naspram različitih baza podataka**.(4)** Ovaj fenomen naročito dolazi do

izražaja prilikom forenzičkih DNA analiza prilikom identifikacija žrtava prouzrokovanih masovnim katastrofama, gdje populacija nestalih dolazi iz različitih etničkih skupina. Dobar primjer za to je identifikacija žrtava tsunamija na Tajlandu (TTDVI), gdje su domicilno stanovništvo i zapadni turisti stradali u gotovo jednakom omjeru. **(104,105)**

Naravno, žarišta SNP-ova kojima je u ovom istraživanju posvećeno najviše pažnje nisu jedina mjesta na kojima se javljaju razlike između sekvenci unutar testirane populacije. Ukoliko se analiziraju obje HV regije, I i II, otprilike 60% tipova mtDNA je zastupljeno u bazama podataka samo jedanput. **(106)** Nijedna od sekvenci mtDNA obrađena u okviru ove studije s odstupanjima od CRS na lokusima izvan detaljno obrađenih petnaest nije se pojavila više od jednom. Izračunati GGIP za tipove 31, 32, i 33, koji se pojavljuju po jednom unutar testiranih 294 uzorka, iznosi 1%, naspram 0,9% za sekvence koji nisu uopće zabilježene, što je prihvatljivo odstupanje**.(15)**

Odabranih petnaest lokusa nosi preko 90% diverziteta među obrađenim uzorcima. Ovakav odabir je bio neophodan za provođenje drugog dijela istraživanja koje je podrazumijevalo stvaranje protokola analiza utemeljenog na jednobaznoj ekstenziji, i provjeru komplementarnosti tako dobivenih rezultata s rezultatima sekvenciranja po Sangeru. Cilj razvijanja ovakvog protokola je višestruk, od pojednostavljivanja procedure analize SNP-ova, do poboljšanog kapaciteta analize miješanih uzoraka.

Prvi korak u provođenju ovog istraživanja podrazumijevao je stvaranje početnica za žarišta SNP-ova koje nisu pronađene u referentnoj literaturi. Pet takvih početnica, čiji su uvjeti stvaranja opisani u poglavlju Materijali i metode, su dale jasne signale visokoga intenziteta u jediničnim reakcijama. Prosječna visina signala (*peak height)* i intenzitet signala (*peak area)* kod ovih početnica u jediničnim reakcijama su bili veći od početnica čije su sekvence preuzete iz literature.

Budući da su reakcije jednobaznih ekstenzija provedene kombinacijom početnica koje se nalaze u literaturi i onih koje su kreirane uzimajući u obzir isključivo populacijske podatke prikupljene u ovoj studiji, njihova međusobna komplementarnost je bila od iznimne važnosti za uspjeh eksperimenta. **(97, 107,**

108), Takva komplementarnost je potvrđena korištenjem *Primer Express* programa, kao i dipleks reakcijama između svake od početnica.**(109)** Početnice s poli T repovima su planski kreirane tako da rezultati budu vidljivi na jednom elektroferogramu, s ciljem da svih 15 lokusa može biti analizirano u dvije multipleks reakcije jednobazne ekstenzije. Tijekom provođenja eksperimenta uočeno je da multipleksiranje više od 5 početnica dovodi do gubitka signala na jednom ili dva lokusa, u čemu su prednjačili signali dobiveni od početnica Mt16172b, Mt16224b i Mt16304. S obzirom da u provedenim dipleks reakcijama ove početnice nisu stvarale dimere s ostalim (niti s onim kreiranim za ovo istraživanje, niti s onim preuzetim iz literature), moguća rješenja bi mogla biti u produženju početnica za 1 ili 2 nukleotida, kakva i vidimo u istraživanju provedenom od strane Chemale i dr. **(107)**, i podizanju temperature topljenja za 2 do 5 stupnjeva. **(110)** U praksi, planirano tipiziranje 15 odabranih lokusa u 2 multipleks reakcije, je zamijenjeno profiliranjem u 3 reakcije. Takav način ne produžava značajno ukupno trajanje tipizacije, ali povećava potrošnju kemikalija potrebnih za proces jednobazne ekstenzije, pa samim tim i troškove reakcije. S obzirom da nije primijećeno vezanje početnica jednih na drugu, podizanje broja početnica u multipleks reakciji na sedam ili osam se može postići daljnjom optimizacijom protokola.

U stvaranju početnica, stavljanju poli-timinskih repova, i njihovom multipleksiranju, posebno se je vodilo računa da fragmenti budu što je moguće manji. U retrospektivi, veličina fragmenta nije uticala na intenzitet signala jednobazne ektenzije, a fragmentima veličine veće od 25 bp nisu smetali nespecifični produkti amplifikacije koji bi se, ukoliko su bili prisutni, izgubili iza markera od 20bp. S obzirom da su sve početnice kojima su stavljeni poli-timinski repovi sintetizirane i bez njih, napravljene su jedinične reakcije s obje inačice takvih početnica. Nisu zabilježne razlike u intenzitetu signala fragmenata amplificiranih s početnicama bez poli-timinskih repova, i amplificiranih s onima koje su ih imale. Iskustvo proizašlo iz ovog istraživanja govori da se kontrola veličine fragmenata dodavanjem poli-timinskih repova na početnice može vršiti bez straha za kvalitetno očitavanje rezultata amplifikacije.

Najveći produkt reakcija jednobazne ekstenzije dobiven je od početnice Mt16126bMP, koji je uz 26 dodanih timinskih nukleotida iznosio 46 bp, odnosno 50 bp na elektroferogramu. Vrijedi spomenuti da se kontrola veličine fragmenata u studiji Argac i dr. i Chemale i dr. radila stavljanjem tetranukleotidnih repova (GACT), umjesto isključivo politiminskih, kako je to učinjeno u ovom istraživanju. **(3,107)**

Odnos broja početnica koje ciljaju glavni lanac DNA, naspram broja onih koje ciljaju komplementarni, ili odnos prednjih i zadnjih početnica, kako se one u praksi zovu, u ovoj studiji iznosi 6:9. Osim prilagođavanja prilikom analize fragmenata koji su amplificirani zadnjim početnicama, iz razloga što one daju signal koji odgovara nukleotidu koji je komplementaran s onim koji se uočava prilikom sekvenciranja, nisu uočene druge razlike. Za žarište na lokusu 16093 sintetizrane su obje odgovarajuće početnice, prednja i zadnja. Nije uočena nikakva razlika u intenzitetu signala u provedenim jediničnim reakcijama.

Jedan od osnovnih razloga provođenja ovog istraživanja je pokušaj unapređenja tipizacije mtDNA kod miješanih uzoraka. Nemogućnost tipizacije miješanih uzoraka, kakva je većina onih s mjesta zločina, je mtDNA analizu u velikoj mjeri isključilo iz forenzičke prakse (osim kad su u pitanju uzorci dlake), te se ista u većini slučajeva koristi u svrhu identifikacije. **(47)** Ipak, osnovna prednost mitohondrijske DNA ostaje njezina količina u stanici **(34)**, i u slučajevima procesuiranja uzoraka s mjesta zločina u kojima je upravo nedostatak genetskog materijala osnovni i najčešći problem. To predstavlja potencijal koji se ne smije zanemariti.

Sve reakcije jednobazne ekstenzije miješanih uzoraka, bilo da su bile jedinične ili multipleks, su pokazale prisutnost istih fragmenata kao i onda kada su uzorci od kojih su mješavine napravljene procesuirani individualno. Multipleks reakcije miješanih uzoraka nisu pokazale gubitak signala ni na jednom od lokusa u većoj mjeri nego procesiranje jediničnih uzoraka.

Miješani uzorci podvrgnuti reakcijama jednobazne ekstenzije su učinjeni u omjerima 1:1, 1:4 i 1:10. Iako je evidentirana razlika u jačini signala za dobivene fragmente inačica datog SNP-a kod nesimetričnih mješavina (1:4 i 1:10), ona nije pratila omjer u kojem su genetski materijali pomiješani, što bi mogla biti posljedica

činjenice da dvije PCR reakcije prethode detekciji. To ne znači da je nemoguće utvrditi odnos između intenziteta signala na elektroferogramu i zastupljenosti genetskih materijala unutar mješavine, ali je neophodno procesuirati znatno veći broj takvih uzoraka pod kontroliranim uvjetima. Ovaj aspekt studije otvara vrata dodatnom istraživanju glede povezanosti odnosa količina DNA s odnosima intenziteta signala.

Ovakav način profiliranja mtDNA u sebi nosi još jednu potencijalnu prednost u analizi uzoraka s mjesta zločina koji vrlo često predstavljaju mješavine tri ili vise različitih DNA. No priroda svih opisanih SNP-ava je da su isključivo dinukleotidni, što bi trebalo omogućiti dobivanje upotrebljivih rezultata. Naravno, ovaj zaključak treba uzeti s oprezom, jer ekstenzivne mješavine mogu pokazati prisutnost obje inačice SNP-ova na većem broju testiranih lokusa, što rezultate takve analize čini neupotrebljivim za podudaranje s nespornim uzorcima. Utvrđivanje udjela pojedinog genetskoga materijala unutar mješavine na osnovu intenziteta signala bi, i u ovakvim slučajevima, bilo od velike vrijednosti.

Sama činjenica da je završna metoda instrumentalne analize kod reakcija jednobazne ekstenzije fragmentarna analiza poput one koju koristimo prilikom tipizacije STR markera, čini ovu metodu manje zahtjevnu od punog sekvenciranja. Ove dvije metode prate vrlo sličan protokol do finalne detekcije na sekvenceru, koji se sastoji od ekstrakcije, po dvije PCR amplifikacije i purifikacije. **(100, 101)** Razlika je što finalana detekcija reakcije jednobazne ekstenzije traje oko 20 minuta, dok detekcija potpune HV1 sekvence u jednom smjeru traje 120 minuta, pri čemu se ne smije zaboraviti da ista mora biti ponovljena i u suprotnom smjeru. To znači da za kompletnu sekvencu HV1 regije potvrđenu i s prednjom i sa zadnjom početnicom treba 240 minuta, naspram 60 minuta za 15 obrađenih SNP žarišta u tri multipleks reakcije. Osim toga, reakcije sekvenciranja su znatno osjetljivije i u prosjeku se tri puta više ponavljaju od reakcija fragmentarne analize. Nadalje, analiza čitavih sekvenci je dugotrajan posao, nasuprot analize fragmenata kod reakcija jednobazne ekstenzije, koja je svodi na opservaciju boje signala date veličine.

Kao što količinu mtDNA u stanici pokušavamo iskoristiti u forenzičkoj analizi, isto tako moramo se suočiti s njenim najvećim nedostatkom, a to je svakako mala

varijabilnost. Korištenje jednobazne ekstenzije sa sobom nosi jednake posljedice kao i svako drugo testiranje specifično za pojedine SNP-ove, a to je da daje odgovor isključivo na pitanje što se nalazi na specifičnom lokusu. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da, ukoliko analizu rezultata ograničimo na izabranih 15 lokusa, 32,65% uzoraka bude prijavljeno identično CRS-u. Provođenje istraživanja slično ovom, koje će pronaći specifična žarišta u datoj populaciji i na HV2 regije, i za njih kreirati sličan protokol detekcije zasnovan na jednobaznoj ekstenziji, bi ublažilo ovaj problem. Za uzorke koje ni tako ne bi bilo moguće segregirati, povratak metodi kompletnog sekvenciranja je jedino moguće rješenje.

Metoda jednobazne ekstenzije nije jedina metoda koja je usmjerena na specifična žarišta SNP-ova. Zabilježene su studije koje koriste tipiziranje pomoću linearnog niza (*Linnear array typing)***(65),** kompetitivno vezanje kombinacije oligonukleotida specifičnih za obje inačice SNP-a (*SSO – Sequence Specific Oligonucleotides,* oligonukleotidi specifični za sekvenciju DNA*)***(94),** pa čak i one koje koriste HPLC denaturaciju (*High Performance Liquid Chromatography* – protočna kromatografija visokih performansi). **(5)** Sve ove tehnike su ponudile alternativu klasičnom sekvenciranju, ali potrebna količina DNA za takve eksperimente u pravilu prelazi 1,5 ng. Nadalje, od spomenutih metoda jedino analizom specifičnim oligonukleotidima moguće je tipizirati miješane uzorke, ali količina potrebne DNA čini analizu u praksi slabije upotrebljivom.

Minimalna količina DNA na kojoj su izvršene multipleks reakcije jednobazne ekstenzije je iznosila 162 pg/μL. Intenzitet i čistoća signala na tom uzorku upućuju da će metoda ostati funkcionalna i sa znatno manjim količinama u prvobitnoj PCR reakciji, što ide u prilog primjeni metode u forenzičkoj praksi. Sve to ukazuje na neophodnost dodatnih istraživanja vezanih za uspostavljanje donje granice količine DNA potrebne za uspješnu tipizaciju.

7. Zaključci

U ovom eksperimentalnom i analitičkom istraživanju ispitana je prisutnost žarišta SNP-ova na HV-1 regiji mitohondrijske DNA na 294 uzorka prikupljena od nesrodnih pojedinaca iz populacije Bosne i Hercegovine. Također je ispitana i učinkovitost protokola tipiziranja odabranih SNP-ova protokolom jednobazne ekstenzije pomoću početnica kreiranih za tu svrhu.

Prisutnost i varijabilnost SNP-ova utvrđena je potpunim sekvenciranjem HV-1 regije Sangerovom metodom, dok je analiza jednobaznom ekstenzijom provedena korištenjem ABI SNAPShot kemije.

Na temelju provedenih eksperimenata i dobivenih rezultata, a u skladu s postavljenim ciljevima ovog istraživanja i usporedbom s dosadašnjim istraživanjima, dolazi se do sljedećih zaključaka:

1. Izdvaja se petnaest žarista SNP-ova na HV-1 regiji u testiranoj populaciji.
2. Postotne zastupljenosti alternativnih inačica SNP-ova na tim žarišima kreću se između 2,04% i 20,75%.
3. Izbor lokusa žarišta SNP-ova i izračunate vrijednosti GGIP, kao i usporedba rezultata s drugim objavljenim studijama ukazuje na specifičnosti unutar testirane populacije, što predstavlja unapređenje u upotrebi analize mtDNA u svakodnevnoj forenzičkoj praksi, i što je izuzetno bitno, uzimajući u obzir da je analiza mtDNA metoda izbora onda kada je nemoguće dobiti upotrebljive STR profile.
4. Signifikantnost podudaranja utemeljenog na analizi HV-1 regije unutar testirane populacije je znatno manja nego kod onog utemeljenog na podudaranjima na STR biljezima unutar iste populacije, ali se konačan statistički odnos ne može utvrditi zbog linearne prirode nasljeđivanja mtDNA.

5. Jedinične reakcije jednobazne ektenzije sa svih 15 početnica karakterističnih za odabrana žarišta SNP-ova dala su u potpunosti identične rezultate onima dobivenim sekvenciranjem po Sangeru.
6. Početnice kreirane za ovo istraživanje nisu pokazale nikakve inhibirajuće reakcije, niti među sobom, kao ni s početnicama preuzetim iz literature, što je omogućilo nesmetano provođenje multipleks reakcija.
7. Dodavanje poli-timinskih repova izabranim početnicama radi manipulacije fragmenata nije smanjilo njihovu učinkovitost.
8. Kombinacije do pet početnica nisu pokazivale gubitak signala, dok je kod kombinacija s više od pet početnica zabilježen gubitak signala na jednom ili dva lokusa. To znači da su potrebne tri reakcije za tipiziranje svih 15 odabranih žarišta.
9. Jedinične i multipleks reakcije početnica za jednobaznu ekstenziju uspješno su se diferencirale između inačica SNP-a u mješavinama različitih DNA u omjerima 1:1, 1:4 i 1:10, što mtDNA analizi daje mogućnost tipiziranja miješanih uzoraka.
10. Metoda analize izabranih žarišta SNP-ova multipleks reakcijama jednobazne ekstenzije značajno pojednostavljuje proces dobivanja rezultata, kao i vrijeme potrebno za analizu istih.
11. Analiza izabranih 15 žarišta HV-1 regije reakcijama jednobazne ekstenzije dodatno smanjuje informativnost mtDNA rezultata, s obzirom da 32,65 % od svih dobivenih tipova predstavlja tip I, odnosno tip komplementaran CRS-u.
12. Provedeno istraživanje otvara potrebu daljnjeg istraživanja u pravcu definiranja žarišta iste populacije na HV-2 regiji, kao i utvrđivanja odnosa jačine signala i količine pojedinih DNA u miješanim uzorcima.

8. Sažetak

Cilj rada: utvrđivanje žarišta SNP-ova na HV-1 regiji u populaciji Bosne i Hercegovine, utvrđivanje zastupljenosti alternativnih inačica SNP-ova na utvrđenim žarištima, utvrđivanje zastupljenosti tipova mtDNA unutar procesiranih uzoraka, i kreiranje protokola za detekciju istih putem metode jednobazne ekstenzije.

Materijali i metode: iz uzorka od 300 bukalnih sluznica uzetih od nesrodnih pojedinaca izolirana je DNA, na kojoj je amplificirana HV-1 regija korištenjem univerzalnih početnica. Amplificirana HV-1 regija je prvo kvantificirana , a potom i sekvencirana Sangerovom metodom na automatiziranom DNA sekvenceru. Oslanjajući se na tako prikupljene podatke, kreirane su početnice specifične za odabrana žarišta, i provedena je njihova pojedinačna detekcija metodom jednobazne ekstenzije. Nakon toga, kreirane početnice su pomiješane u multipleks reakcije, koje su provedene prvo na individualnim uzorcima, te potom na miješanom uzorcima. U istraživanju provedenom u okviru ove disertacije korišteni su ABI BigDye v1.1, ABI SNAPShot i ABI Quantifiler kitovi, a strojna analiza je napravljena koristeći ABI 3130 Genetic Analyzer i ABI 7700 Sequence Detection System instrumente.

Rezultati: analizom elektroferograma sekvenciranja utvrđena su žarišta pojavljivanja SNP-ova, i izračunate zastupljenosti alternativnih inačica SNP-ova na njima. Dobivene sekvence HV-1 regije su podijeljene u 33 tipa mtDNA. Za sve tipove izračunate su vrijednosti GGIP (Gornje Granice Intervala Pouzdanosti), i LR (*Likelihood Ratio).* Rezultati analize jednobaznom ekstenzijom pokazali su se u potpunosti podudarni s rezultatima sekvenciranja po Sangeru, kako u reakcijama s pojedinačnim početnicama, tako i u multipleks reakcijama. Analize miješanih uzoraka DNA jasno su tipizirale oba tipa mtDNA prisutnih u mješavini.

Zaključci: na osnovu dobivenih rezultata, a u skladu s postavljenim ciljevima ovog istraživanja i njihove usporedbe s dosadašnjim istraživanjima, dolazi se do sljedećih zaključaka: izdvojeno je petnaest SNP žarišta čiji lokusi i zastupljenosti alternativne inačice SNP-a tvore jedinstvenu populacijsku studiju, što je izraženo različitim izračunatim vrijednostima statističke signifikantnosti podudaranja unutar kreirane studije naspram sličnih studija iz literature. Kreirana metoda detekcije profiliranja SNP-ova na utvrđenim žarištima jednobaznom ekstenzijom pokazala se funkcionalnom, a njeni rezultati u potpunosti podudarni s rezultatima sekvenciranja. Također, kreirana metoda detekcije jednobaznom ekstenzijom pokazala je visoku osjetljivost u tipiziranju miješanih uzoraka, području nepokrivenom metodom sekvenciranja po Sangeru.

9. Sažetak na engleskom jeziku

Name of the candidate: Rijad Konjhodžić

Year in which dissertation will be presented: 2014

Dissertation name: Identification of the mitochondrial DNA control region polymorphisms in population of Bosnia and Hercegovina and the development of the protocol for their forensic application

Aim of this study was to establish locations of the SNP hotspots in the HV 1 region, their alternative allele frequencies, as well as creation of a protocol for their typing based on the single base extension (SBE).

Materials and Methods: DNA was extracted from buccal swabs taken from 300 unrelated individuals. Extracted DNA was first quantified using RT-PCR, and then amplified at the HV-1 region of the mtDNA with adequate primers. Resulting amplicons were sequenced by Sanger sequencing using an automated DNA sequencer. Relying on the data thus acquired, primers specific for the chosen hotspots were designed, and samples were typed using SBE method for each SNP in single reactions. After that, designed primers were mixed in multiplex reaction mixes, and samples were typed with those. Created mixed samples from two different DNAs were tested with both singleplex and multiplex reactions.

Results: SNP hotspots and their alternative allele frequencies were determined. Taking these in consideration 33 mtDNA types were observed, with Upper Confidence Interval values and Likelihood Ratios calculated for each type. Results obtained from SBE typing protocol of the samples were identical to Sanger sequencing, both in singleplex and multiplex reactions. SBE protocol successfully typed mixed DNA samples.

Conclusion: Taking into consideration both the loci and the alternative allele frequencies of selected 15 SNPs, it can be concluded that they make a unique population study, which is shown with comparing calculations of the given mtDNA profile uniqueness using this study data and the data from studies found in the literature. Chosen SNP typing by the SBE protocol has shown itself functional, with results absolutely matching those acquired with Sanger sequencing. Furthermore, SBE protocol has shown high sensitivity in typing mixed DNA samples.

10. Literatura

1. Holland MM, Parsons TJ; Mitochondrial DNA sequence analysis – validation and use for forensic casework. Forensic Sci Rev 11:22 – 50; (1999)
2. Melton T, Nelson K; Forensic Mitochondrial DNA Analysis: Two Years of Commercial Casework Experience in the United States, Croat Med J 42(3):298-303, (2001)
3. Argac D, Bulbul O, Shahzad MS, Acar E, Altuncul H, Filoglu G; Optimization and validation of 10 mitochondrial DNA SNPs using SnaPshot kit; Forensic Science International: Genetics, Supplement Series 2; 99-101; (2009)
4. Butler JM; Forensic DNA typing. Academic Press, San Diego (2001)
5. LaBerge G, Shelton R, Danielson P; Forensic Utility of Mitochondrial DNA Analysis Based on Denaturing High Performance Liquid Chromatography, Croat Med J 44(3);281-288, (2003)
6. Quintans B, Alvarez – Iglesias V, Salas A, Lareu M, Carracedo A; Typing mtDNA SNPs of forensic and population interest with snapshot; International Congress Series 1261, 419 -421; (2004)
7. Tillmar A; Populations and Statistics in Forensic Genetics, Linkoping University Medical Dissertations No. 1175, Department of Clinical and Experimental Medicine, Faculty of Health Sciences, (2010)
8. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL; Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA; Nature, 314; 67-73; (1985)
9. Anderson S, AT Bankier, BG Barrell, MH de Bruijn, AR Coulson, J Drouin, IC Eperon, DP Nierlich, BA Roe, F Sanger, PH Schreier, AJ Smith, R Staden, IG Young; Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290:457-65; (1981)

10. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N; Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Nat Genet 23:147; (1999)
11. Foran DR; Relative degradation of nuclear and mitochondrial DNA: An experimental approach; Journal of Forensic Sciences, 51; 766-770 (2006)
12. Jobling M, Gill P; Encoded Evidence: DNA in Forensic analysis; Nature Reviews Genetics, volume 5; 739-751, October (2004)
13. Butler JM, Levin BC; Forensic Applications of the mitochondrial DNA; Trennds in Biotechnology, 16; 158-162; (1998)
14. Irwin JA, Saunier JL, Strouss KM, Sturk KA, Diegoli TM, Just RS, Coble MD, Parson W, Parsons TJ; Development and expansion of high-quality control region databases to improve forensic mtDNA evidence interpretation; Forensic Science International: Genetics, 1(2):154-157; (2007)
15. Carracedo A, Bar W, Lincoln P, Mayr W, Morling N, Olaisen B, et al; DNA comission of the International Society for Forensic Genetics : guidelines for mitochondrial DNA typing; Forensic Sci Int; 110:79-85; (2000)
16. Konjhodzic R, Kubat M, Skavic J, Bosnian Population data for the 15 STR loci in PowerPlex 16 kit, Int J Legal Med. Apr;118(2):119-21; (2004)
17. Sanger F, Coulson AR; A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase; J. Mol. Biol. 94 (3): 441 – 8 (1975)
18. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR; DNA sequencing with chain terminating inhibitors; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74 (12): 5463-7; (1977)
19. Murphy K, Berg K, Eshleman J; Sequencing of genomic DNA by combined amplification and cycle sequencing reaction; Clinical Chemistry 51(1):35-39; (2005)

20. Divne; AM, Nilsson M, Calloway C, Reynolds, R, H Erlich, Allen M, Forensic Casework Analysis Using the HVI/HVII mtDNA Linear Array Assay, J Forensic Sci, May, Vol. 50, No. 3; (2005)
21. Drobnic K, Borsting C, Rockenbauer E, Tomas C, Morling N; Typing of 49 autosomal SNPs by SnaPshot in the Slovenian population; Forensic Science International: Genetics, 4; 125-127; (2010)
22. Kitpipit T, Tobe S, Kitchener A, Gill P, Linacre A; The development and validation of a single SnaPshot multiplex for tiger species and subspecies identification – Implications for forensic purposes; Forensic Science International: Genetics, 6; 250 – 257; (2012)
23. Ristov AA i dr. Metode u molekularnoj biologiji, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, (2007).
24. Pecina – Slaus N i dr; Odabrane Metode Molekularne Biologije; Medicinska Naklada, Zagreb; ISBN – 978-953-176-419-3; (2009)
25. Lewin B; Genes VII; Oxford University Press, ISBN 0 – 19 – 879276- X (2000)
26. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J; Molecular Cell Biology; fourth edition; W.H. Freeman and Co; ISBN 0-7167-3136-3; (2000)
27. Lehninger A, Nelson D, Cox M; Principles of Biochemistry, Worth Publishers, ISBN 0-87901-500-4; (1992)
28. Satoh M, Kuroiwa T; Organization of multiple nucleotids and DNA molecules in mitochondria of a human cell; Experimental Cell Research, 196; 137-140; (1991)
29. Chen XJ, Butow RA; The organization and inheritance of the human mitochondrial genome; Nature Reviews Genetics, 6; 815-825; (2005)
30. Bodenteich A, et al.; Dinucleotide repeat in the human mitochondrial D-loop; Human Molecular Genetics; 1, 140; (1992)
31. Szibor, R et al.; Mitochondrial D-loop 3' (CA) in repeat polymorphism: Optimization of analasys and population data; Electrophoresis, 18; 2857-2860; (1997)

32. Bellance N, Lestienne P, Rossignol R; Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis; Frontiers in Bioscience 14, 4015 – 4034, January 1; (2009)
33. Greenberg BD, Newbold JE, Sugino A; Intraspecific nuleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA; Gene; 21:33 – 49; (1983)
34. Scheffler IE; Mitochondria; New York: Wiley- Liss; (1999)
35. Hutchison CA, Newbold JE, Potter SS, Edgell MH; Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA; Nature, 251: 536-538; (1974)
36. Case JT, Wallace DC; Maternal inheritance of mitochondrial DNA polymorphisms in cultured human fibroblasts; Somatic Cell Genetics; 7:103-108; (1981)
37. Cummins JM; Fertilization and elimination of the paternal mitochondrial genome; Human Reproduction, Vol15. (suppl. 2.); 92-101; (2000)
38. Parsons T, Muniec DS, Sullivan K, Woodyatt N, Alliston- Grenier R, Wilson MR, Berry DI, Holland KA, Weedn VW, Gill P, Holland M; A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region; Nature Genetics 15: 363-367; (1997)
39. Stone AC, et al.; Mitochondrial DNA analysis of the persumptive remains of Jesse James; Journal of Forensic Sciences, 46, 173 – 176; (2001)
40. Levin BC, et al.; A human mitochondrial DNA standard reference material for quality control in forensic identification , medical diagnosis and mutation detection; Genomics, 55; 135-146; (1999)
41. Soares P, Ermini L, Thomson N, Mormina M, Rito T, Rohl A, Salas A, Oppenheimer S, Macaulay V, Richards MB; Correcting for purifying selection: An improved human molecular clock; AM J Hum Genet 84:740; (2009)

42. Sykes B, Leiboff A, Low-Beer J, Tetzner S, Richards M; The origins of the Polynesians: An interpretation from mitochondrial lineage analysis; American Journal of Human Genetics; 57:1463-1475; (1995)
43. Wilson MR, Polanskey D, Butler J, DiZinnio JA, Repogle J, Budowle B; Extraction, PCR amplification, and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts; BioTechniques 18;662-669; (1995)
44. Melton T; Mitochondrial DNA heteroplasmy; Forensic Sci Rev; 16, 1-20; (2004)
45. Wilson MR, Allard MW, Monson K, Miller KWP, Budowle B; Recomendations for consistent treatment of length variants in the human mitochondrial DNA control region; Forensic Science Communicaation 4(1); (2002)
46. Grzybowski T; Extremely high levels of human mitochondrial DNA heteroplasmy in single hair roots; Electrophoresis, Mar; 21(5); (2000)
47. Budowle B, Allard M, Wilson M, Chakarborty R; Forensics and mitochondrial DNA: Applications, debates and foundations; Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.; 4, 119 – 141; (2003)
48. You F, Hou N, Gu Y, Luo M, Ma Y, Hane D, Lazo G, Dvorak J, Anderson D; BatchPrimer3: A high throughput web application for PCR and sequencing primer design; BMC Bioinformatics, 9:253;(2008)
49. Melton T, Dimick G, Higgins B, Lindstrom L, Nelson K; Forensic mitochondrial DNA analysis of 691 casework hairs; J Forensic Sci, vol. 50, No. 1, Jan.; (2005)
50. Cvjetan S et all; Frequencies of mtDNA Haplogroups in Southeastern Europe; Coll. Antropol. 28 (2004) 1: 193-198; UCD 572.9:575.13 (497); (2004)
51. Tolk HV, Peric M, Barac L, Martinovic – Klaric I, Janicijevic B, Rudan I, Parik J, Vilems R, Rudan P, MtDNA Haplogroups in the Populations of Croatian Adriatic Islands, Coll Antropol. 24(2000) 2; 267-279 UDC 572;575.116 497; (2000)

52. Lagerstorm-Fermer M, Olsson C, Forsgren L; Heteroplasmy of the human mtDNA control region remains constant during life; American Journal of Human Genetics 68(5): 99-301; (2001)
53. Ivanov PL, et al.; Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II; Nature Genetics, 9; 9-10; (1996)
54. Santos C, Sierra B, Alvarez L, Ramos A, Fernandez E, Nogues R, Aluja MP; Frequency and pattern of Heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA; J Mol Evol, 67:191-200; (2008)
55. Ricchetti M, Tekaia F, Dujon B; Continued colonization of the human genome by mitochondrial DNA; PloS Biol.; Sep; 2(9):E273. Epub, (2004)
56. Bensasson D, Zhang D, Hartl DL, Hewit GM; Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witness; Trends Ecol. Evol., Jun 1;16(6):314-321; (2001)
57. Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Brandon M, Wallace DC; Mitochondrial DNA-like sequences in the nucleus (NUMTs): insights into our African origins and the mechanisms of foreign DNA integration; Hum Mutat., Feb;23(2): 125-33; (2004)
58. Melton T, Holland C, Holland M; Forensic Mitochondrial DNA Analysis: Current Practice and Future Potential; Forensic Sci Rev 24:101; (2012)
59. Bender K, Schneider PM, Rittner C; Application of mtDNA sequence analysis in forensic casework for the identification of human remains; Forensic Science international, 113; 103-107; (2000)
60. Ginther C, Issel-Tarver L, King MC Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth, Nature Genetics 2:135-138; (1992)
61. Buckleton J, Triggs C, Walsh S (editors), Forensic DNA Evidence Interprentation, CRC Press, ISBN 0-8493-3017-3 (1999)

62. Miething F, Hering S, Hanschke B, Dressler J; Effect of fixation to the degredation of nuclear and mitochondrial DNA in different tissues; Journal of Histochemistry & Cytochemistry, March, vol. 54, no 3, 371-374 (2006)
63. Werret D, Pinchin R, Hale R; Problem solving: DNA data acquisition and analysis; Profiles DNA, 2; 3-6; (1998)
64. Butler JM, Coble MD, Vallone PM; STRs vs SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing; Forensic Science, Medicine and Pathology; 3:200-205; (2007)
65. Gabriel MN, Huffine EF, Ryan JH, Holland MM, Parsons TJ; Improved mtDNA Sequence Analysis of Forensic Remains Using a «mini- primer set» Amplification Strategy; J Forensic Sci 2001;46:247-53; (2001)
66. Budowle B, Wilson MR, DiZinno JA, Staufer C, Fasano MA, Holland MM, et al. Mitochondrial DNA regions HVI and HVII population data. Forensic Sci Int 103:23-35; (1999)
67. Coble MD, et al.; Mystery solved: The identification of the two missing Romanov children using DNA analysis; PloS ONE, e4838; (2009)
68. Just RS, et al.; Titanic's unknown child: the critical role of the mitochondrial DNA coding region in a reidentification effort; Forensic Science International: Genetics, 5; 231-235 (2011)
69. Crespillo M, et al.; Results of the 2003 – 2004 GEP – ISFG collaborative study on mitochondrial DNA: Focus on the mt DNA profile of a mixed semen –saliva stain; Forensic Science International, 160; 157-167; (2006)
70. Irwin JA, Parson W, Coble M, Just R; mtGenomereference population databases and the future of forensic mtDNA analysis; Forensic Science International: Genetics, 5; 222-225; (2011)
71. Pereira F, Carnerio J, Van Asch B; A guide for mitochondrial DNA analysis in non-human forensic investigations; The Open Forensic Science Journal; 3, 33-44; (2010)

72. Budowle B, et al.; Automated alignment and nomenclature for consistent treatment of polymorphisms in the human mitochondrial DNA control region; Journal of Forensic Sciences, 55; 1190-1195; (2010)
73. Yuryev A (editor), PCR Primer Design, Humana Press, ISBN 978-1-58829 – 725 – 9; (2007)
74. Budowle B, Polanskey D, Allard M, Chakraborty Ranajit; Addressing the use of phylogenetics for identification os sequences in error in the SWGDAM Mitochondrial DNA Database; J Forensic SCI, Nov., Vol. 49, No 6
75. Isenberg A, Moore J; Mitochondrial DNA Analysis at the FBI Laboratory; Forensic Science Communications, July 1999, vol 1, number 2; US Department of Justice; (2004)
76. Miller W P, Budowle B; A Compendium of Human Mitochondrial DNA Control Region: Development of an International Standard Forensic Database Croat Med Journal 42(3):315-327, (2001)
77. Brenner, CH; Fundamental problem of forensic mathematics - the evidential value of a rare haplotype; Forensic Science International: Genetics, 4; 281- 291; (2010)
78. Murray V; Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction; Nucleic Acids Research 17:8889; (1989)
79. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, et al.; Fluoroscence detection in automaed DNA sequence analysis; Nature 321 (6071): 674-9; (1986)
80. Smith LM, Fung S, Hunkapiller MW, Hunkapiller TJ, Hood LE; The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus : synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis; Nucleic Acids Res. 13(7): 2399-412; (1985)
81. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ; Forensic application of 'DNA fingerprints'; Nature, 318, 577-579; (1985)

82. Horai S, Hayasaka K; Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA , American Journal of Human Genetics; 46:828-842; (1990)
83. Bendall KE, Macaulay VA, Baker JR, Sykes BC; Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region; Am J Hum Genet;59:1276-87; (1996)
84. Fourney RM; Mitochondrial DNA and forensic analysis: A primer for law enforcement; Canadian Society of Forensic Sciences Journal, 31; 45-53; (1998)
85. Melton T, Clifford S, Kayser M, Nasidze I, Batzer M, Stoneking M; Diversity and heterogeneity in mitochondrial DNA of North American populations; J Forensic Sci; 46:46-52; (2001)
86. Meyer S, Weiss G, von Haeseler A. Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA. Genetics; 152:1103-10; (1999)
87. Parson W, Parsons TJ, Scheithauer R, Holland M; Population data for 101 Caucasian mitochondrial D-loop sequences: Application of mtDNA sequence analysis to a forensic case; International Journal Legal Medicine; 111: 124-132; (1998)
88. Rousselet F, Mangin P; Mitochondrial DNA polymorphisms: A study of 50 French Caucasian individuals and application to forensic casework; International Journal of Legal Medicine; 111:292-298; (1998)
89. Parson W, Bandelt H; Extended guidelines for mt DNA typing of population data in forensic science; Forensic Science International : Genetics, I; 13-19; (2007)
90. Hoong LL, Lek KC; Genetic polymorphisms in mitochondrial DNA hypervariable regions I, II and III of the Malaysian population; Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology; Vol 13 (2): 79-85, (2005)
91. Zgonjanin D, Veselinovic I, Kubat M, Furac I, Antov M, Loncar E, Tasic M, Vukovic R, Omorjan R, Sequence Polymorphism of the

Mitochondrial DNA Control Region in the Population of Vojvodina Province, Serbia; Leg Med (Tokyo), PMID 19962932; (2009)

92. Parsons T, Coble M. Increasing the Forensic Discrimination of Mitochondrial DNA Testing through analysis of the entire Mitochondrial DNA Genome, Croatian Medical Journal; 42(3):304 – 309; (2001)
93. Coble MD, et al.; Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians; Int. J. Leg. Med., 118, 137-146; (2004)
94. Stoneking M, Hedgecock D, Higuch RG, Vigilant L, Erlich HA. Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence specific – oligonucletide probes, American Journal of Human Genetics; 48:370 – 382; (1991)
95. Tully G, Sullivan KM, Nixon P, Stones RE, Gill P. Rapid detection of mitochondrial polymorphisms using multiplex solid-phase fluorescent minisequencing. Genomics; 34: 107-113; (1996)
96. Livak KJ. Allelic discrimination using flourogenic probes and 5' nuclease assay. Genet Anal; 14:143-9; (1999)
97. Vallone P, Just R, Coble M, Butler J, Parsons T A multiplex allele specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome, Int. J Legal Med 118; 147 – 157; (2004)
98. QiAmp DNA Mini and Blood Mini Handbook; Third edition; Qiagen, June (2012)
99. ABI Quantifiler kits User manual; Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, (2012)
100. ABI BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, (2002)
101. ABI Prism SnaPshot Multiplex kit; Protocol; Applied Biosystems; (2010)

102. Hartl D; A Primer of Population Genetics, Sinauer Associates Inc, Sunderland Massachusetts, ISBN 0-87893-304-2, (2000)
103. Lehocky I, Baldovic M, Kadasi L, Metspalu E; A Database of Mitochondrial DNA Hypervariable Regions I and II and Sequences of Individuals from Slovakia; Forensic Science International: Genetics 2; e53 – e59; (2008)
104. Prinz M, Carracedo A, Mayr WR, Morling N, Parsons TJ, Sajantila A, Schethaur R, Schmitter H, Schneider PM; DNA Commision of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification; Forensic Science International: Genetics 1(1): 10; PMID 19083722; (2007)
105. Jun Ya, Deng Y, Yuan Zhe YZ, Jun Yu; Preliminary DNA identification for the Tsunami victims in Thailand; Genomics, Proteomics & Bioinformatics 3(3): 143; PMID 16487080; (2005)
106. Isenberg AR, Moore JM; Forensic Mitochondrial DNA analysis; Forensic Science Handbook; Volume II; Upper Saddle River, New Jersey; Prentice Hall; (2004)
107. Chemale G, Paneto GG, Menezes Menezes MA, de Freitas JM, Jacques GS, Barretto Cicarelli RM, Fagundes PR; Development and Validation of a D – loop mtDNA SNP assay for the Screening of Specimens in Forensic Casework; Forensic Science International: Genetics 7; 353 – 358; (2013)
108. Vallone P; Analyzing Single Nucleotide Polymorphisms; AAFS Annual Meeting; Atlanta GA; (2002)
109. Kaderali L, Primer Design for Multiplexed Genotyping, PCR Primer Design, Methods in Molecular Biology 402, Humana Press, (2007)
110. Kwok PY et al. Single nucleotide polymorphisms Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, Humana press, Totowa, New Jersey (2003)

11. Biografija

Rijad Konjhodžić rođen je 13.01.1976. godine u Sarajevu, gdje je završio osnovnu školu i dva razreda gimnazije. Maturirao je u Zagrebu 1994. godine, a iste godine počeo pohađati La Roche College u Pittsbughu, S.A.D. 1998. diplomirao je molekularnu biologiju i kemiju na istom Sveučilištu. Nakon završetka studija vraća se u Sarajevo, gdje osniva laboratoriju za molekularnu dijagnostiku pri Kliničkom centru Univerziteta u Sarajevu. U razdoblju od 2000. do 2006. radio je kao koordinator DNA laboratorija pri Međunarodnoj komisiji za nestale osobe (ICMP). Godine 2005. imenovan je za stalnog sudskog vještaka iz područja DNA analize. Trenutno radi kao voditelj Odsjeka za molekularnu dijagnostiku i citologiju pri Kliničkoj patologiji KCU Sarajevo. Autor i koautor je više objavljenih znanstvenih radova.