

Molekularnogenetska preiskava 300 let starih skeletov iz Auerspergove grobnice

Molecular genetic analyses of 300-year old skeletons from Auersperg tomb

Irena Zupanič Pajnič

Inštitut za sodno medicino, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

višja znanstvena sodelavka in doc. dr. Irena Zupanič Pajnič, univ. dipl. biol. Inštitut za sodno medicino, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana
t: 01 5437215
irena.zupanic@mf.uni-lj.si

Ključne besede:

starodavna DNA; genetska tipizacija; zobje; mikrosateliti; mtDNA

Key words:

ancient DNA; genetic typing; teeth; microsatellites; mtDNA

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2013; 82: 796–808

Prispelo: 15. mar. 2013,
Sprejeto: 27. maj 2013

Izvleček

Izhodišča: Leta 2009 so arheologi na tržnici v Ljubljani, v stranski kapeli cerkve Frančiškanskega samostana, ki je bila Auerspergova grobnica, izkopali pet skeletov iz 17. stoletja. Ob vznožju enega od njih so našli kovinsko posodo s srcem, na kateri je bilo vgravirano ime Ferdinand II. in letnica rojstva in smrti (1655–1706). Leta 2011 smo na Inštitutu za sodno medicino opravili molekularnogenetsko preiskavo skeletov iz Auerspergove kapele. Skeleti so bili slabo ohranjeni, kosti so razpadle na majhne koščke. Le pri dveh skeletih so bili ohranjeni fragmenti stegnic in zobje, pri ostalih pa smo za molekularnogenetsko preiskavo uporabili dele lobanj.

Metode: Kosti in zobe smo očistili, odstranili površinsko kontaminacijo in jih zmleli v prah. Pred ekstrakcijo genomske DNA smo kostni in zobni prah demineralizirali. Izolirano DNA smo prečistili v napravi Biorobot EZ1 (Qiagen). Jedrno DNA vzorcev smo kvantificirali z metodo polimerazne verižne reakcije (PCR) v realnem času. Za tipizacijo mikrosatelitov avtosomne DNA smo uporabili komplet Investigator ES-Splex (Qiagen), NGM (Applied Biosystems) in MiniFiler (Applied Biosystems), za mikrosatelit kromosoma Y pa komplet YFiler (Applied Biosystems). Haplotipe mtDNA smo pridobili s sekvenciranjem regij HVI in HVII.

Rezultati: Iz kosti in zob skeletov iz Auerspergove grobnice smo pridobili do 10,7 ng DNA/g zobnega prahu. Iz preko 300 let starih skeletov nam je uspelo pridobiti jedrno DNA za uspešno

tipizacijo mikrosatelitov. Iz enega od njih smo pridobili komplet moški genetski profil jedrne avtosomne DNA, skoraj komplet haplotip kromosoma Y, ki nam omogoča sledenje očetovi liniji, in haplotip mtDNA, ki nam omogoča sledenje materini liniji. Dobljeni genetski profili se niso ujemali s profili oseb iz eliminacijske podatkovne zbirke, kar potrjuje njihovo avtentičnost.

Zaključki: Da bomo lahko skelete identificirali, jih moramo primerjati s še živečimi neposrednimi potomci po očetovi ali materini liniji, kar je odvisno od tega, ali se bodo neposredni potomci odločili za sodelovanje ali ne. Molekularnogenetska tipizacija skeletov iz Auerspergove grobnice je prva arheogenetska preiskava, opravljena v Sloveniji.

Abstract

Background: In 2009 the archaeologists excavated five skeletons from a 17th-century archaeological site in Ljubljana. They were found in the side chapel of the church in the Franciscans monastery, which was the Auerspergs' tomb. Beside the skeletons, the finds revealed a bronze bowl with the heart, and the name of Ferdinand II and the years of birth and death (1655–1706) engraved. In 2011, we were asked to identify those five skeletons. The skeletons were poorly preserved and bones degraded to small pieces. Fragments of femurs and teeth were preserved only in two skeletons, therefore for the remaining three the fragments of cranium were used for molecular genetic analyses.

Methods: We cleaned the bones and teeth, removed surface contamination, and ground them into powder. Prior to DNA isolation, bone or tooth powder was decalcified. DNA was purified in the Biorobot EZ1 device (Qiagen). Nuclear DNA of the samples was quantified using real-time polymerase chain reaction (PCR). Short tandem repeat (STR) typing of autosomal DNA was performed using Investigator ESSplex Kit (Qiagen), the NGM Kit (Applied Biosystems) and the MiniFiler Kit (Applied Biosystems). Typing of the Y-STRs was performed using the YFiler Kit (Applied Biosystems). The two hypervariable regions HVI and HVII of the mtDNA were sequenced.

Results: We were able to extract up to 10.7 ng DNA/g of tooth powder from Auersperg chapel

archaeological site skeletal remains. We managed to obtain nuclear DNA for successful STR typing from skeletal remains that were over 300 years old. From one skeleton we obtained a complete male genetic profile of autosomal DNA, almost complete Y-STR haplotype, which enabled us to track the paternal line and mtDNA haplotype for HVI and HVII regions, which enabled us to track the maternal line. After comparing the profiles with elimination database, no match was found, and thus the authenticity of genetic profiles was confirmed.

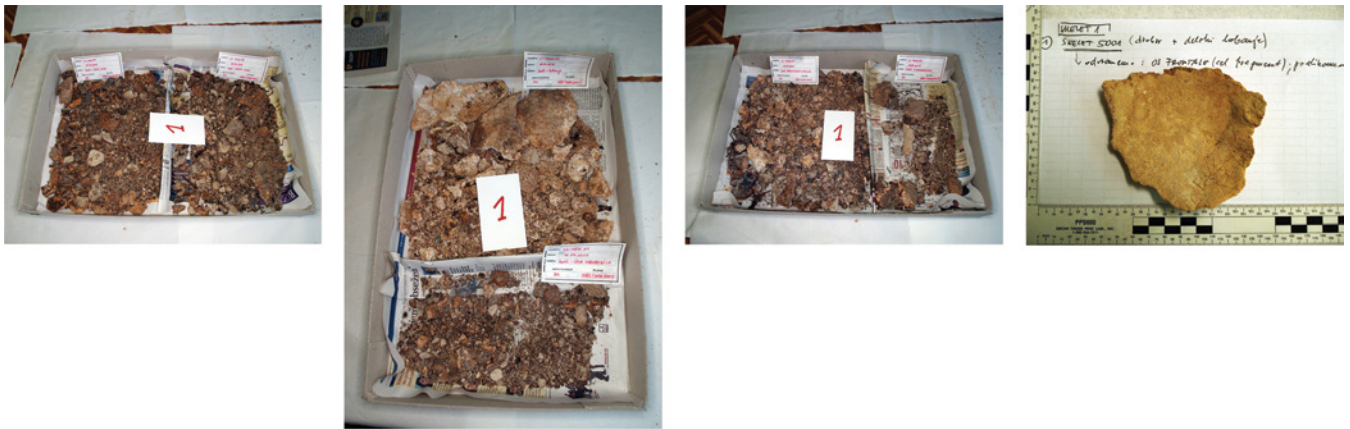
Conclusions: Now we are waiting for the family reference samples for comparison with genetic profiles obtained in order to identify the excavated skeletons. This is the first archaeogenetic research performed in Slovenia.

Uvod

Leta 2009 so arheologi na arheološkem najdišču na tržnici v Ljubljani, v stranski kapeli cerkve Frančiškanskega samostana, za katero je znano, da je bila Auerspergova grobnica, izkopali pet skeletov. Ob vznožju enega od njih so našli kovinsko posodo, v kateri je bilo srce. Na pokrovu posode je bil vgraviran Auerspergov grb, ime Ferdinand II. ter letnica rojstva in smrti (1655–1706), iz česar sklepajo, da gre za skelete iz 17. in 18. stoletja. Leta 2011 smo v Laboratoriju za molekularno genetiko Inštituta za sodno medicino opravili molekularnogenetsko preiskavo skeletov in srca iz omenjene grobnice. Skeleti so bili zelo slabo ohranjeni, saj so kosti razpadle na majhne koščke. Vzrok za močno razgrajenost skeletov je bila pogosta poplavljenost grobnice zaradi bližine reke Ljubljanice. Auerspergi ali Turjaški so bili najvplivnejša aristokratska družina na Slovenskem in ena najbogatejših družin v Habsburški monarhiji. Kranjsko so naselili v 11. stoletju, slovensko ozemlje pa zapustili pred drugo svetovno vojno.

V človeških posmrtnih ostankih se DNA najdlje ohrani v kosteh in zobeh, kjer se veže na mineralno osnovo (hidroksiapatit). Ta vezava ji omogoča večjo stabilnost in daljšo ohranitev.¹ Vendar pa se v zelo starih skeletnih ostankih ohrani malo DNA, ki je pogosto razgrajena na zelo kratke fragmente,^{2,3} prisotni so tudi inhibitorji polimerazne

verižne reakcije (PCR),⁴ uspešnost tipizacije pa poleg tega omejuje visoka izpostavljenost starodavne DNA kontaminaciji s sodobno DNA.^{1,5} Ohranjenost DNA v skeletnih ostankih s starostjo pada, na njeno ohranitev pa v največji meri vpliva okolje, v katerem se skeletni ostanki nahajajo.^{6,7} Najpomembnejši dejavniki okolja so temperatura, vlažnost, pH, kemijske lastnosti zemlje in prisotnost mikroorganizmov. Hitra izsušitev posmrtnih ostankov in nizka raven izpostavljenosti UV sevanju omogočata boljšo ohranitev DNA. Ta se bolje ohrani v zemlji z visoko koncentracijo soli, nevtralnimi ali rahlo bazičnim pH, nizko vsebnostjo huminskih kislin in nizko vlažnostjo.⁸ Ključni dejavnik ohranitve DNA je temperatura okolice. Najbolje je DNA ohranjena v bioloških vzorcih, najdenih v jamah in trajno zamrznjenih tleh, kjer so povprečne letne temperature nizke.^{9,10} Na količino in kakovost DNA v skeletnih ostankih pa vpliva tudi način njihovega shranjevanja po izkopu.^{11,12} Uspešnost genetske tipizacije je večja pri sveže izkopanih skeletih kot pri tistih, ki so bili več let shranjeni pri sobni temperaturi (npr. v muzejskih zbirkah), in sicer zlasti zaradi višjih temperatur okolice in umivanja skeletnih ostankov pred shranjevanjem, kar zmanjša pH in koncentracijo soli v kosteh. Na uspešnost tipizacije starodavne DNA vplivajo tudi metode, uporabljene za eks-



Slika 1: Skelet 1 in fragment lobanje, ki smo ga molekularnogenetsko analizirali.

trakcijo in pomnoževanje v reakciji PCR.^{13,14} Različne študije so pokazale, da je metoda popolne demineralizacije najprimernejša za ekstrakcijo DNA iz starodavnih skeletnih ostankov.¹⁵⁻¹⁷ Zato smo za tipizacijo skeletov iz Auerspergove grobnice namesto metode ekstrakcije z delno demineralizacijo¹⁸ uporabili tisto s popolno demineralizacijo.

Pri identifikaciji starih skeletnih ostankov preiskujemo, če je to le mogoče, polimorfizme jedrne DNA (avtosomne kromosome in kromosom Y) in polimorfizme mitohondrijske DNA (mtDNA). Slednja se v celici nahaja v številnih kopijah, kar ji v starih skeletnih ostankih omogoča daljšo ohranitev v primerjavi z jedrno DNA. Krožna oblika in mitohondrijska ovojnica jo ščitita pred razgradnjo. Deduje se po materi in se prenese na vse potomce, ne glede na spol, kar nam omogoča sledenje materini liniji.¹⁹ Kromosom Y pa se deduje po očetu, zato lahko sledimo očetovi liniji.^{20,21} Zaradi odsotnosti rekombinacije in dedovanja po materi imajo osebe z enakimi zaporedji nukleotidov mtDNA skupnega ženskega in osebe z enakimi haplotipi kromosoma Y skupnega moškega prednika. To je osnova za identifikacijo skeletnih ostankov s pomočjo analize mtDNA in kromosoma Y. Ti genetski označevalci so zelo uporabni v genealoških preiskavah, kjer imamo kot primerjalne družinske vzorce na razpolago samo več generacij oddaljene neposredne potomce po materini ali očetovi liniji. Zaradi močno razgrajene DNA, pridobljene iz starih skeletnih ostankov, so do nedavnega molekularnogenetsko uspešno preiskovali predvsem mtDNA. Tako so identificirali finske vojake, padle v Rusiji v drugi svetovni vojni,²² francoskega

prestolonaslednika Ludvika XVII,^{23,24} Martina Bormanna,²⁵ Jesseja Jamesa²⁶ in nedavno kralja Richarda III. V novejših študijah, ki uporabljajo nove metode ekstrakcije in pomnoževanja DNA, pa so v nekaj primerih že uspešno tipizirali jedrne mikrosatelite dednine, pridobljene iz starih kosti in zob. V tem kontekstu je treba omeniti identifikacije padlih ameriških vojakov iz časa prve in druge svetovne ter vietnamske vojne,²⁷ žrtev druge svetovne vojne iz masovnih grobišč v Sloveniji, ki smo jih opravili v našem laboratoriju,^{28,29} identifikacijo Nikolaja Kopernika,³⁰ genetsko preiskavo lobanje Jana Kochanowskega³¹ in druge.

Iz starih kosti in zob običajno pridobimo zelo majhne količine razgrajene endogene DNA, ki jo težko razlikujemo od veliko pogostejše sodobne (eksogene DNA). Zato je kontaminacija resen problem pri preiskavah starodavne DNA. Do kontaminacije s sodobno DNA lahko pride ob izkopu, pa tudi pri kasnejših antropoloških in molekularnogenetskih preiskavah.³² Pri arheološkemu izkopu skeletnih ostankov je obvezna uporaba čistih rokavic, zaščitne obleke ter maske za usta in nos. Skeletne ostanke moramo shraniti v zračne zaboje v čistih in suhih prostorih, kjer so za razvoj mikroorganizmov slabši pogoji.³³ Zelo pomembno je, da vzporedno z vzorci kosti in zob testiramo tudi ekstrakcijske in amplifikacijske negativne kontrole ter osebje, ki je prišlo v stik s skeleti, kar nam omogoča sledenje kontaminaciji v primeru, da do nje pride. Za posamezen skelet je potrebno tipizirati vsaj dva vzorca in pri tem obakrat dobiti identične genetske profile, prav tako pa je potrebno isti vzorec tipizirati vsaj dvakrat.³⁴



Slika 2: Skelet 2, fragment lobanje in trije fragmenti dolgih kosti, ki smo jih molekularnogenetsko analizirali.

Za preiskavo DNA iz skeletnih ostankov so po mnenju Edsona s sodelavci³⁵ najprimernejše dolge kosti, zlasti stegnenice, najmanj pa kosti lobanje. S primerjalno študijo uspešnosti tipizacije jedrne DNA na skeletnih ostankih iz masovnih grobišč druge svetovne vojne smo v našem laboratoriju ugotovili, da so za tipizacijo najprimernejši zobje, tem sledijo stegnenice in nato golenice.³⁶ Do podobnih zaključkov so prišli tudi Miloš s sod.³⁷ in Misner s sod.³⁸ Skeleti iz Auerspergove grobnice so bili močno fragmentirani, zato za molekularnogenetsko preiskavo za večino skeletov nismo uspeli pridobiti skeletnega materiala, v katerem se ohrani največ DNA. Le pri dveh skeletih so bili ohranjeni močno porozni kratki fragmenti stegnenic in zobje, pri ostalih pa smo bili za molekularnogenetsko preiskavo primorani uporabiti dele lobanj.

Metode

Preprečevanje kontaminacije

Pri molekularnogenetskih preiskavah skeletov in srca iz Auerspergove grobnice smo sledili mednarodnim priporočilom za zagotavljanje kakovosti in preprečevanje

kontaminacije.^{1,39-49} Sledljivost v primeru pojava kontaminacije smo zagotovili s pravo eliminacijske podatkovne zbirke, v katero smo vključili vse, ki so prišli v stik s skeletnimi ostanki (deset arheologov, antropologinja in sedem oseb iz Inštituta za sodno medicino). Zanje smo pridobili genetske profile jedrne avtosomne DNA, mtDNA in kromosoma Y. Čistost ekstrakcijskih in reagentov PCR ter plastike smo preverili z vključitvijo negativnih kontrol v postopek ekstrakcije, pomnoževanja v reakciji PCR in sekvenciranja. S tem smo sledili morebitni kontaminaciji vzorcev preko uporabljanih reagentov in plastike. Antropologinjo smo pred pričetkom antropološke preiskave oskrbeli z razkužilnimi sredstvi, laboratorijskimi rokavicami, kapami, maskami in plašči za enkratno uporabo ter jo seznanili s pravilnim načinom rokovanja s skeletnimi ostanki.

Stanje skeletov po arheološkem izkopu in vzorčenje za molekularnogenetsko preiskavo

Skeletni ostanki iz Auerspergove grobnice so bili v izredno slabem stanju. Razen dveh delno ohranjenih lobanj so bile kosti

Slika 3: Skelet 3 in fragment lobanje, ki smo ga molekularnogenetsko analizirali.





Slika 4: Skelet 4, zgornja čeljustnica z zobmi, trije fragmenti desne stegenice in dva zoba, ki smo jih molekularnogenetsko analizirali.

ohranjene le v fragmentih, pri treh skeletih zob ni bilo in pri dveh med delčki kosti ni bilo možno določiti fragmentov dolgih cevastih kosti. Za genetsko preiskavo smo zato pri skeletu 1, 2 in 3 uporabili fragmente lobanj, pri skeletu 2 tudi tri fragmente cevastih kosti in pri skeletih 4 in 5 zobe ter dele stegenic. Iz srca, ki je bilo ob izkopu najdeno v kovinski posodi, smo odvzeli majhen del tkiva iz notranjosti in s površine. Vse skeletne ostanke in srce smo fotodokumentirali.

Na Sliki 1 so prikazani ostanki skeleta 1, razvrščeni v tri kartonaste škatle, ter fragment lobanje, ki smo ga molekularnogenetsko analizirali.

Na Sliki 2 so prikazani ostanki skeleta 2, razvrščeni v dve kartonasti škatli, fragment krova lobanje in trije fragmenti teles dolgih cevastih kosti, ki smo jih molekularnogenetsko analizirali.

Na Sliki 3 so prikazani ostanki skeleta 3, razvrščeni v dve kartonasti škatli, ter fragment zatilnice, ki smo ga molekularnogenetsko analizirali.

Na Sliki 4 so prikazani ostanki skeleta 4, razvrščeni v osem kartonastih škatel, zgornja čeljustnica z zobmi, trije fragmenti desne stegenice in dva zoba, odvzeta iz zgornje čeljustnice. Enega od fragmentov desne ste-

gnenice in oba zoba smo molekularnogenetsko analizirali.

Na Sliki 5 so prikazani ostanki skeleta 5, razvrščeni v štiri kartonaste škatle, lobanja, zgornja čeljustnica z zobmi, spodnja čeljustnica z zobmi, močno porozen fragment desne stegenice, dva zoba, odvzeta iz zgornje, in dva, odvzeta iz spodnje čeljustnice. Fragment desne stegenice in vse štiri zobe smo molekularnogenetsko analizirali.

Na Sliki 6 je prikazano srce iz kovinske posode in v plastične epruvete odvzeti vzorčki tkiva iz notranjosti in s površine srca, ki smo jih molekularnogenetsko analizirali.

Pridobitev genomske DNA

Iz sline oseb, ki so sestavljale eliminacijsko podatkovno zbirko, smo pridobili genomsko DNA v napravi Biorobot EZ1 (Qiagen), ob uporabi kompleta EZ1 DNA Investigator Kit in istoimenske raziskovalne kartice (Qiagen), skladno z navodili proizvajalca.⁵⁰

Postopek osamitve genomske DNA iz kosti in zob je podrobno opisan v prispevku avtorice,¹⁸ razlika je le v tem, da smo delno dekalifikacijo zamenjali s popolno,



Slika 5: Skelet 5 z lobanjo, zgornja in spodnja čeljustnica z zobmi, fragment desne stegnenice in štirje zobje, ki smo jih molekularnogenetsko analizirali.

pri čemer smo količino uporabljene EDTA povečali na 8,5 ml. Postopek je vključeval več korakov: čiščenje, mletje, dekalifikacijo in ekstrakcijo DNA iz kostnega in zobnega prahu. Površinsko kontaminacijo smo odstranili s kombinacijo fizičnega odstranjevanja površine (pri zobeh smo ta postopek zamenjali z obsevanjem z UV svetlobo) ter spiranja v 5-odstotni raztopini detergenta Alconox (Alconox Inc.), v vodi in 80-odstotnem etanolu. Kostni in zobni prah smo pridobili v homogenizatorju TissueLyser (Retsch) po navodilih proizvajalca,⁵¹ pri čemer smo kosti pred mletjem, zobe in kovinske komore ohladili s tekočim dušikom. Celoten postopek je potekal v prostoru, namenjenem izključno delu s starimi kostmi in zobmi. Mehansko čiščenje smo izvedli v zaprti citostatični varnostni komori C-(MaxPro)³-130 (Iskra Pio). Genomsko DNA smo izolirali iz 0,5 g kostnega in zobnega prahu, po predhodni 24-urni popolni dekalifikaciji v raztopini 0,5 M EDTA. Nato smo vzorcu dodali proteinazo K in DTT ter ga inkubirali preko noči pri 56 °C. Po centrifugiranju smo iz supernatanta v napravi Biorobot EZ1(Qiagen)

izolirali genomsko DNA z uporabo kompleta EZ1 DNA Investigator Kit in istoimenske raziskovalne kartice (Qiagen), tako kot to priporoča proizvajalec.⁵⁰ V postopek smo vključili tudi negativne kontrole, s čimer smo preverjali čistost izolacijskih reagentov in plastike.

Določitev koncentracije DNA v vzorcu (kvantifikacija)

Vse vzorce DNA smo pred pomnoženjem v reakciji PCR ovrednotili s kvantitativno reakcijo PCR v realnem času. Za kvantifikacijo jedrne DNA smo uporabili komplet Quantifiler Human DNA Quantification kit (Applied Biosystems). Reakcijo smo izvedli v aparaturi 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), s pomočjo računalniškega programa HID Real-Time PCR Analysis Software verzija 1.1 (Applied Biosystems), skladno z navodili proizvajalca.⁵²



Slika 6: Srce iz kovinske posode in vzorčki tkiva iz notranjosti in s površine srca, ki smo jih molekularnogenetsko analizirali.

Določitev genetskih profilov avtosomne jedrne DNA, haplotipov kromosoma Y in haplotipov mtDNA

Pri molekularnogenetski preiskavi vzorcev petih skeletov in srca smo opravili tipizacijo jedrne avtosomalne DNA, pri čemer smo profile, dobljene s kompletom NGM (Applied Biosystems), preverili še s kompletoma Investigator ESSplex (Qiagen) in MiniFiler (Applied Biosystems). Določili smo tudi nukleotidna zaporedja regij HVI in HVII mtDNA¹⁹ ter opravili tipizacijo mikrosatelitov na kromosomu Y s kompletom YFiler (Applied Biosystems).⁵³ Za osebe v eliminacijski podatkovni zbirki smo izvedli tipizacijo jedrne avtosomne DNA le s kompletom NGM, določili haplotipe mtDNA, pri moških osebah pa kromosoma Y s kompletom YFiler.

Z amplifikacijskima kompletoma NGM in ESSplex smo sočasno pomnožili 15 mikrosatelitskih področij (D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, D10S1248, D1S1656, D2S1338, D16S539, D22S1045, vWA, D8S1179, FGA, D2S441, D12S391, D19S433) in odsek amelogeninskega X-Y homolognega gena, ki nam je omogočil določitev spola. S kompletom MiniFiler smo sočasno pomnožili 8 mikrosatelitskih področij (D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1PO in FGA) in odsek amelogeninskega gena. Komplet MiniFiler vsebuje tri dodatna področja, ki jih s kompletoma NGM in ESSplex ne pomnožujemo. Skupno število z vsemi tremi kompleti pomnoženih mikrosatelitov je bilo 18. S kompletom YFiler smo soča-

sno pomnožili 17 mikrosatelitskih področij kromosoma Y (DYS456, DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19, DYS385 a/b, DYS393, DYS391, DYS439, DYS635, DYS392, Y GATA H4, DYS437, DYS438 in DYS448). Reakcije smo pri vseh kompletih po navodilih proizvajalcev⁵⁴⁻⁵⁷ izvedli v napravi ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Fluorescentno označene produkte smo ločevali z avtomatskim genskim analizatorjem ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems), ob uporabi tekočega polimera POP 4 in notranjih velikostnih standardov GeneScan-500 LIZ (Applied Biosystems) ter 550 BTO (Qiagen). Genetske profile smo določili s pomočjo računalniških programov Data Collection v 3.0 in GeneMapper ID v 3.2 (Applied Biosystems). Z vsemi omenjenimi kompleti smo posamezen vzorec z reakcijo PCR pomnožili vsaj dvakrat. Vzoredno z vzorci iz arheološkega najdišča smo pri vseh kompletih vedno pomnoževali tudi negativno kontrolo.

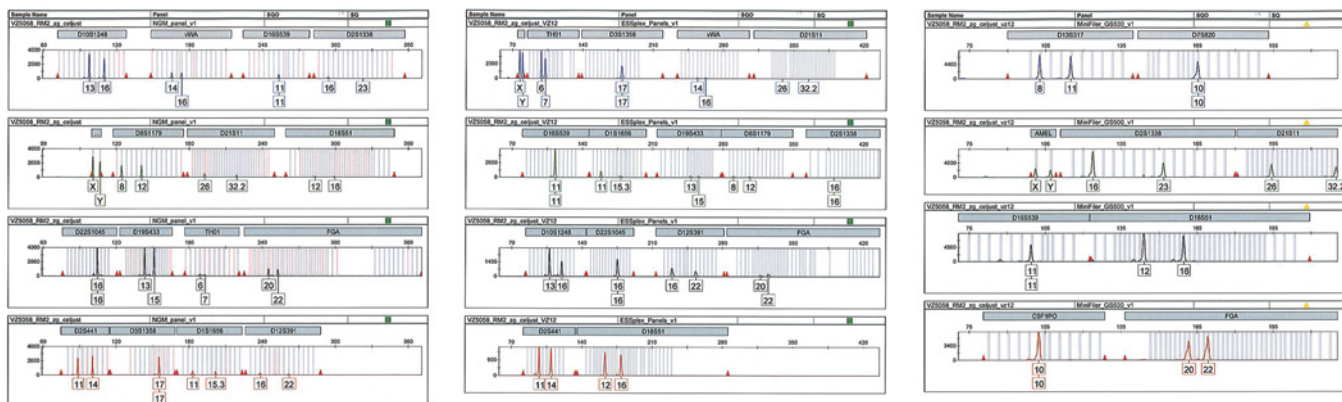
Za določitev haplotipa mtDNA smo v reakciji PCR pomnožili celotno regijo HVI in HVII; in sicer HVI z začetnima oligonukleotidoma L15997/H16401, HVII pa z L00029/H00408.⁵⁸ Vzoredno z vzorci iz arheološkega najdišča smo vedno pomnoževali tudi negativno kontrolo. Sestava reakcijske zmesi in temperaturni pogoji obeh reakcij so opisani v članku Zupanič Pajnič s sod.¹⁹ Reakciji PCR smo izvedli v cikličnem termostatu Biometra UNO-Thermoblock (Biometra). Amplifikacijske produkte smo prečistili z ultrafiltracijskimi enotami Centricon-100

(Millipore Corporation) in jih sekvencirali z metodo avtomatskega neposrednega fluorescentnega sekvenciranja s kompletom BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, version 1.1 (Applied Biosystems). Regiji HVI in HVII smo vedno sekvencirali v obeh smereh in tako s sekvenciranjem težke verige preverili sekvenco, dobljeno s sekvenciranjem lahke verige mtDNA. Reakcijske produkte smo prečistili s kolonami MicroSpin™ G-50 (Amersham Biosciences) in jih ločevali z avtomatskim genskim

analizatorjem ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems), ob uporabi tekočega polimera POP 4 in računalniških programov Data Collection v 3.0 in AB DNA Sequencing Analysis Software v 5.2 (Applied Biosystems). Nukleotidna zaporedja smo v regiji HVI primerjali v območju od 16030–16381, v regiji HVII pa v območju od 55–388, in sicer z »Andersonovo« referenčno sekvenco (CRS), ki jo uporabljamo kot primerjalno nukleotidno zaporedje za razi-

Tabela 1: Koncentracije jedrne DNA (Quantifiler Human DNA Quantification kit–Applied Biosystems), izražena v pg DNA/μl ekstrakta iz vzorcev kosti, zob in srca iz Auerspergove grobnice (RM = desni molar, LM = levi molar).

	Skelet 1 del lobanje	Skelet 2 del lobanje	Skelet 2 del cevaste kosti	Skelet 2 del cevaste kosti	Skelet 2 del cevaste kosti
Izolacija 1	nezaznavno	nezaznavno	2,95 pg/μl	nezaznavno	0,352 pg/μl
Izolacija 2	nezaznavno	nezaznavno	0,225 pg/μl	nezaznavno	nezaznavno
Izolacija 3	nezaznavno	0,66 pg/μl			1,42 pg/μl
Izolacija 4	nezaznavno	1,64 pg/μl			nezaznavno
Izolacija 5	nezaznavno	nezaznavno			nezaznavno
	Skelet 3 del lobanje	Skelet 4 zob RM2 (zgornja čeljust)	Skelet 4 zob RM3 (zgornja čeljust)	Skelet 4 del stegenice	Skelet 5 zob RM2 (zgornja čeljust)
Izolacija 1	nezaznavno	67,1 pg/μl	72,5 pg/μl	nezaznavno	nezaznavno
Izolacija 2	nezaznavno	30,0 pg/μl	55,6 pg/μl	nezaznavno	2,37 pg/μl
Izolacija 3	nezaznavno	nezaznavno	91,1 pg/μl		nezaznavno
Izolacija 4		nezaznavno	107 pg/μl		nezaznavno
Izolacija 5		nezaznavno			nezaznavno
Izolacija 6					nezaznavno
	Skelet 5 zob LM3 (spodnja čeljust)	Skelet 5 zob LM3 (zgornja čeljust)	Skelet 5 zob LM2 (spodnja čeljust)	Skelet 5 del stegenice	Srce (notranjost)
Izolacija 1	nezaznavno	nezaznavno	nezaznavno	nezaznavno	nezaznavno
Izolacija 2	nezaznavno	1,21 pg/μl	nezaznavno	nezaznavno	
Izolacija 3	nezaznavno	nezaznavno	nezaznavno		
Izolacija 4	nezaznavno	nezaznavno	nezaznavno		
	Srce (zunanjost)	Izolacijska negativna kontrola 1	Izolacijska negativna kontrola 2	Izolacijska negativna kontrola 3	Izolacijska negativna kontrola 4
Izolacija 1	nezaznavno	nezaznavno	nezaznavno	nezaznavno	nezaznavno
Izolacija 2					
	Izolacijska negativna kontrola 5	Izolacijska negativna kontrola 6	Izolacijska negativna kontrola 7	Izolacijska negativna kontrola 8	
Izolacija 1	nezaznavno	nezaznavno	nezaznavno	nezaznavno	



Slika 7: Elektroferogrami avtosomnih genetskih profilov zob skeleta 4, ki smo jih pridobili s kompleti NGM (Applied Biosystems), Investigator ESSplex (Qiagen) in Minifiler (Applied Biosystems).

skovanje polimorfizmov človeške mtDNA, z računalniškim programom BioEdit.⁵⁹

Rezultati

Pridobitev genomske DNA

Iz vzorcev skeletnih ostankov in srca smo pridobili kar 63 ekstraktov, 55 iz kosti, zob in srca ter 8 iz negativnih kontrol, ki smo jih obdelovali vzporedno z vsako serijo ekstrahiranih vzorcev. Največkrat (6 zaporednih ekstrahiranih vzorcev) smo ekstrahirali DNA iz desnega molarja 2 zgornje čeljustnice skeleta 5. S petimi zaporednimi ekstrahiranimi vzorci smo sledili desni molar 2 zgornje čeljustnice skeleta 4, fragment lobanje skeleta 1, fragment lobanje skeleta 2 in fragment telesa dolge cevaste kosti skeleta 2. Štirikrat smo zaporedno ekstrahirali DNA iz desnega molarja 3 zgornje čeljustnice skeleta 4, levega molarja 3 iz spodnje čeljustnice skeleta 5, levega molarja 3 iz zgornje čeljustnice skeleta 5 in levega molarja 2 iz spodnje čeljustnice skeleta 5. Trikrat smo zaporedno ekstrahirali DNA iz fragmenta zatilnice skeleta 3. Iz dveh vzorcev fragmentov teles dolgih cevastih kosti skeleta 2, fragmenta desne stegenice skeleta 4, fragmenta stegenice skeleta 5 in vzorcev

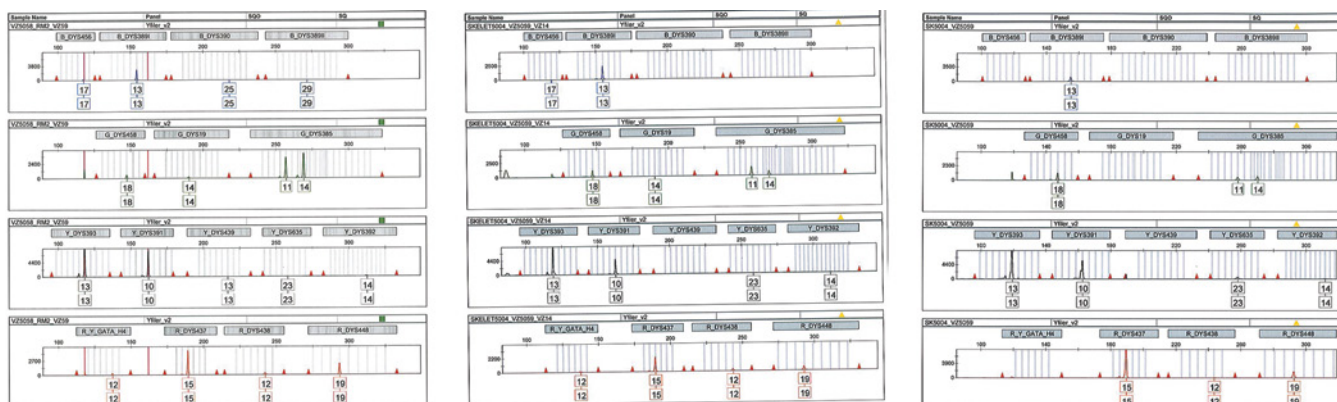
srca pa smo pridobili DNA v dveh zaporednih ekstrahiranih vzorcih. Za vse našete vzorce so v Tabeli 1 prikazane koncentracije pridobljene jedrne DNA.

Določitev koncentracije DNA v vzorcu (kvantifikacija)

Določili smo koncentracije DNA v vseh ekstrahiranih vzorcih. Med 55 ekstrakti kar v 41 nismo zaznali jedrne DNA, preostalih 14 ekstraktov pa je vsebovalo najmanj 0,225 pg DNA/μl in največ 107 pg DNA/μl. Največ DNA smo pridobili iz zob skeleta 4, kar je nakazovalo možnost uspešne tipizacije jedrne DNA. Pri skeletu 4 je bilo veliko DNA v zobeh, v fragmentu desne stegenice pa jedrne DNA nismo zasledili. Pri ostalih skeletih so bili obeti za uspešno tipizacijo jedrne DNA po rezultatih kvantifikacije zelo slabi, saj so bile količine ekstrahirane DNA v vzorcih nizke ali pa DNA sploh nismo zaznali. Tako pri skeletu 1 v nobenem ekstraktu nismo zaznali jedrne DNA. Enake rezultate smo dobili tudi za skelet 3 in za vzorce srca. V vzorcih skeletov 2 in 5 je bilo prisotne zelo malo jedrne DNA oziroma je sploh nismo zaznali. Tako smo iz fragmenta lobanje in fragmentov teles dolgih cevastih

Tabela 2: Avtosomni genetski profil (NGM – Applied Biosystems, Investigator ESSplex–Qiagen, Minifiler – Applied Biosystems) skeleta 4.

Vzorec/mikrosatelit	D10S1248	vWA	D16S539	D2S1338	D8S1179	D21S11	D18S51
Skelet 4	13/16	14/16	11/11	16/23	8/12	26/32.2	12/16
Vzorec/mikrosatelit	D22S1045	D19S433	TH01	FGA	D2S441	D3S1358	D1S1656
Skelet 4	16/16	13/15	6/7	20/22	11/14	17/17	11/15.3
Vzorec/mikrosatelit	D12S391	D13S317	D7S820	CSF1PO	Amelogenin		
Skelet 4	16/22	8/11	10/10	10/10	X/Y		



Slika 8: Elektroferogrami haplotipov kromosoma Y zob skeleta 4, ki smo jih pridobili s kompletom Yfiler (Applied Biosystems).

kosti skeleta 2 uspeli pridobiti največ 2,95 pg DNA/ μ l, iz fragmenta stegenice in zob skeleta 5 pa največ 2,37 pg DNA/ μ l. To so količine, ki običajno ne zagotavljajo uspešne tipizacije jedrne DNA še posebej, če je DNA slabo ohranjena in razgrajena na krajše fragmente. Jedrne DNA nismo zaznali pri izolacijskih negativnih kontrolah, kar kaže na ustreznost postopka osamitve (čistost uporabljenih reagentov in laboratorijske plastike) in odsotnost kontaminacije vzorcev s sodobno DNA. Koncentracije ekstrahirane jedrne DNA (v pg/ μ l) iz vzorcev kosti in zob ter srca so podane v Tabeli 1.

Določitev genetskih profilov avtosomne jedrne DNA, haplotipov kromosoma Y in haplotipov mtDNA

Največ DNA smo pridobili iz zob skeleta 4 (do 10,7 ng DNA/g zobnega prahu), kar je zadostovalo za uspešno tipizacijo jedrne DNA in mtDNA. Za skelet 4 smo uspeli tako pridobiti kompleten genetski profil na vseh 18 mikrosatelitih in na amelogeninskem genu. Tipizacija slednjega je pokazala, da gre za ostanke moške osebe. Pri tipizaciji skeleta 3 in srca pa pomnoževanje avtosomalnih mikrosatelitov ni bilo uspešno. Pri tipizaciji skeletov 1, 2 in 5 so se pomnožili le posamezni mikrosateliti, zato nismo mogli sestaviti zanesljivih genetskih profilov za nobenega

od njih. Avtosomni genetski profil skeleta 4 je prikazan v Tabeli 2.

Slika 7 prikazuje elektroferograme avtosomnih genetskih profilov zob skeleta 4, ki smo jih pridobili s kompleti NGM, ESSplex in Minifiler.

Pri preučevanju mikrosatelitov kromosoma Y smo uspeli iz zob skeleta 4 sestaviti genetski profil za 14 mikrosatelitov. Za preostale skelete in srce pa tipizacija mikrosatelitov kromosoma Y ni bila uspešna. Haplotip kromosoma Y skeleta 4, ki smo ga določili s kompletom Yfiler, je prikazan v Tabeli 3.

Slika 8 prikazuje elektroferograme haplotipov kromosoma Y skeleta 4, ki smo jih pridobili z zaporednim pomnoževanjem s kompletom Yfiler.

Za vseh pet skeletov in srce smo opravili sekvenciranje regij HVI in HVII mtDNA. Za skelete 1, 2, 3, 5 in srce nismo mogli z zanesljivostjo določiti haplotipov mtDNA, zaradi izredno nizke vsebnosti mtDNA, ki običajno ni veliko presegala ravni laboratorijskih negativnih kontrol. Le v primeru skeleta 4 smo uspeli določiti haplotip mtDNA. Za regijo HVI (območje od 16030–16381) je bilo zaporedje identično referenčni sekvenca, za regijo HVII (območje od 55–388) pa so bile razlike glede na referenčno sekvenco sledeče: 263(G), 309.1(C) in 315.1(C).

Med primerjavo avtosomnih genetskih profilov, haplotipov kromosoma Y in haplo-

Tabela 3: Haplotip kromosoma Y (Yfiler – Applied Biosystems) skeleta 4.

Vzorec/mikrosatelit	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385a/b	DYS393
Skelet 4	17	13			18	14	11/14	13
Vzorec/mikrosatelit	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	DYSH4	DYS437	DYS438	DYS448
Skelet 4	10		23	14	12	15	12	19

tipov mtDNA skeleta 4 z osebami iz eliminacijske podatkovne zbirke nismo zasledili nobenega ujemanja, kar izključuje možnost kontaminacije tako med izkopom (pri arheološkem zbiranju in shranjevanju kosti) kot med antropološko in genetsko preiskavo. Tudi vse izolacijske in amplifikacijske negativne kontrole, ki smo jih izvedli pri tipizaciji jedrne DNA, so bile ustrezne, dve ali več zaporednih amplifikacij jedrne DNA z različnimi amplifikacijskimi kompleti pa so dale ponovljive oziroma identične rezultate. Vse to seveda potrjuje avtentičnost jedrnih in mitohondrijskih genetskih profilov skeleta 4.

Razpravljanje in zaključki

Iz več kot 300 let starih zob skeleta 4, ki so ga skupaj s še štirimi slabo ohranjenimi skeleti leta 2009 arheologi izkopali v Auerspergovi grobnici na tržnici v Ljubljani, smo uspeli pridobiti jedrno DNA za uspešno tipizacijo mikrosatelitskih področij avtosomne DNA in kromosoma Y. V primeru avtosomnih mikrosatelitov smo uspeli sestaviti kompleten genetski profil vseh 18 mikrosatelitov in amelogeninskega gena. Tipizacija sledenjega je pokazala, da gre za skeletne ostanke moške osebe. S pomnoževanjem mikrosatelitov kromosoma Y smo uspeli sestaviti genetski profil za skoraj vse analizirane mikrosatelite, kar nam bo v veliko pomoč pri sledenju očetovi liniji in za primerjavo s še živečimi potomci po očetovi strani. Uspeli smo določiti tudi haplotip mtDNA, ki omogoča sledenje materini liniji in prav tako primerjavo s še živečimi potomci po materini strani. Glede na popolno genetsko informacijo tako avtosomnih mikrosatelitov, mikrosatelitov kromosoma Y in haplotipov mtDNA, ki smo jo uspeli določiti v vzorcih zob skeleta 4, je vsekakor smiselno nadaljevanje molekularnogenetske identifikacije s primerjavo genetskih profilov še živečih sorodnikov. Trenutno sta v teku genealoška preiskava in iskanje neposrednih potomcev, ki pa se morajo za sodelovanje prostovoljno odločiti.

Molekularnogenetska preiskava skeletov iz Auerspergove grobnice je prva molekularnoantropološka študija v Sloveniji, ki smo jo

opravili v sodelovanju z arheologi in nam daje smernice za nadaljnje molekularnoantropološke preiskave arheoloških najdišč v naši državi. Uporabljeni postopek ekstrakcije DNA je izredno učinkovit, saj smo iz preko 300 let starih zob skeleta 4 pridobili do 10,7 ng DNA/g zobnega prahu. Naša odločitev o uporabi popolne demineralizacije v postopku osamitve genomske DNA se je izkazala za pravilno. Najnovejše raziskave namreč kažejo, da je zlasti za pridobitev DNA iz starih skeletov najučinkovitejša izvedba popolne demineralizacije, medtem ko za relativno sveže kosti in zobe ta ni nujno potrebna.^{15-17,60} V nobenem od ekstraktov kosti ali zob nismo zaznali inhibicijskih snovi, kar pomeni, da je čiščenje DNA z napravo Biorobot EZ1 (Qiagen) zelo učinkovito, in sicer ne le za forenzične vzorce,⁶⁰⁻⁶² pač pa tudi za DNA, izolirano iz starih kosti in zob.⁶⁴ Vseh pet skeletov iz Auerspergove grobnice je bilo zelo slabo ohranjenih, a nam je kljub temu iz skeleta 4 uspelo pridobiti genetske profile jedrne DNA. To lahko pripišemo dejstvu, da smo molekularnogenetsko preiskavo opravili razmeroma hitro po arheološkem izkopu. Znano je namreč, da je uspešnost genetske tipizacije večja pri sveže izkopanih skeletih, kot pri tistih, shranjenih v muzejskih zbirkah.^{11,12} Tudi uporabljene metode tipizacije mikrosatelitov in sekvenciranja mtDNA so bile uspešne, saj smo uspeli iz omenjenega skeleta pridobiti popolne genetske profile avtosomne jedrne DNA, skoraj popolne haplotipe kromosoma Y in celoten haplotip mtDNA. Ugotovimo lahko, da je za identifikacijo starih skeletnih ostankov smiselno analizirati tako polimorfizme jedrne avtosomne DNA, kromosoma Y in mtDNA, saj z večjim številom genetskih označevalcev močno povečamo možnost sledenja še živečim sorodnikom, kar smo dokazali že pri identifikaciji žrtev druge svetovne vojne.²⁹

Literatura

- Kemp BM, Smith DG. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Sci Int* 2005; 154: 53–61.
- Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S. Ancient DNA. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 353–59.
- Alaeddini R, Walsh SJ, Abbas A. Forensic implications of genetic analysis from degraded DNA—A review. *Forensic Sci Int Genet* 2010; 4: 149–157.
- Alaeddini R. Forensic implication of PCR inhibition—A review. *Forensic Sci Int Genet* 2012; 6: 297–305.
- Anderung C, Persson P, Bouwman A, Elburg R, Gotherstrom A. Fishing for ancient DNA. *Forensic Sci Int Genet* 2008; 2: 104–107.
- Höss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Pääbo S. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1304–1307.
- Poinar HN, Hoss M, Bada JL, Pääbo S. Amino acid racemisation and the preservation of ancient DNA. *Science* 1996; 272: 864–866.
- Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993; 362: 709–15.
- Smith CI, Chamberlain AT, Riley MS, Cooper A, Stringer CB, Collins MJ. Neanderthal DNA. Not just old but old and cold? *Nature* 2001; 410: 771–772.
- Smith CI, Chamberlain AT, Riley MS, Stringer C, Collins MJ. The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *J Hum Evol* 2003; 45: 203–217.
- Burger J, Hummel S, Hermann B, Henke W. DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis* 1999; 20: 1722–28.
- Pruvost M, Schwarz R, Correia VB. Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 739–744.
- Putkonen MT, Palo JU, Cano JM, Hedman M, Sajantila A. Factors affecting the STR amplification success in poorly preserved bone samples. *Investigative genetics* 2010; 1: 9.
- Irwin JA, Just RS, Loreille OM, Parsons TJ. Characterization of a modified amplification approach for improved STR recovery from severely degraded skeletal elements. *Forensic Sci Int Genet* 2012; 6: 578–587.
- Jakubowska J, Maciejewska A, Pawlowski R. Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation. *Int J Legal Med* 2012; 126: 173–178.
- Loreille OM, Diegoli TM, Irwin JA, Coble MD, Parsons TJ. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Sci Int Genet* 2007; 1: 191–5.
- Amory S, Huel R, Bilić A, Loreille O, Parsons TJ. Automatable full demineralization DNA extraction procedure from degraded skeletal remains. *Forensic Sci Int Genet* 2012; 6: 398–406.
- Zupanič Pajnič I. Visoko učinkovita metoda ekstrakcije DNA iz skeletnih ostankov (Highly efficient DNA extraction method from skeletal remains). *Zdrav Vestn* 2011; 80: 171–181.
- Zupanič Pajnič I, Balažič J, Komel R. Sequence polymorphism of the mitochondrial DNA control region in the Slovenian population. *Int J Legal Med* 2004; 118: 1–4.
- Šterlinko H, Zupanič Pajnič I, Balažič J, Komel R. Human Y-specific STR haplotypes in a Slovenian population sample. *Forensic Sci Int* 2001; 120: 226–228.
- Gusmao L, Butler JM, Carracedo A, Gill P, Kayser M, Mayr WR, Morling N, Prinz M, Roewer L, Tyler-Smith C, Schneider PM. DNA commission of the international society of forensic genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y STRs in the forensic analysis. *Int J Legal Med* 2006; 120: 191–200.
- Palo JU, Hedman M, Soderholm N, Sajantila A. Repatriation and identification of Finnish World War II soldiers. *Croat Med J* 2007; 48: 528–535.
- Jehaes E, Decorte R, Peneau A, Petrie JH, Boiry PA, Gilissen A, et al. Mitochondrial DNA analysis on remains of a putative son of Louis XVI king of France and Marie-Antoinette. *Eur J Hum Genet* 1998; 6: 383–95.
- Jehaes E, Toprak K, Vanderheyden N, Pfeiffer H, Cassiman JJ, Brinkmann B, et al. Pitfalls in the analysis of mitochondrial DNA from ancient specimens and the consequences for forensic DNA analysis: the historical case of the putative heart of Louis XVII. *Int J Legal Med* 2001; 115: 135–41.
- Anslinger K, Weichhold G, Keil W, Bayer B, Eisenmenger W. Identification of the skeletal remains of Martin Bormann by mtDNA analysis. *Int J Legal Med* 2001; 114: 194–196.
- Stone AC, Starrs JE, Stoneking M. Mitochondrial DNA analysis of the presumptive remains of Jesse James. *J Forensic Sci* 2001; 46: 173–176.
- Irwin JA, Leney MD, Loreille O, Barritt SM, Christensen AF, Holland TD, Smith BC, Parsons TJ. Application of low copy number STR typing to the identification of aged, degraded skeletal remains. *J Forensic Sci* 2007; 52: 1322–1327.
- Zupanič Pajnič I. Molekularnogenetska identifikacija domobranskih žrtev (Molecular genetic identification of Slovenian home guard victims). *Zdrav Vestn* 2008; 77: 745–750.
- Zupanič Pajnič I, Gornjak Pogorelec B, Balažič J. Molecular genetic identification of skeletal remains from the Second World War Konfin I mass grave in Slovenia. *Int J Legal Med* 2010; 124: 307–317.
- Bogdanowicz W, Allen M, Branicki W, Lembring M, Gajewska M, Kupiec T. Genetic identification of putative remains of the famous astronomer Nicolaus Copernicus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 12279–82.
- Kupiec T, Branicki W. Genetic examination of the putative skull of Jan Kochanowski reveals its female sex. *Croat Med J* 2011; 52: 403–409.
- Graham EAM. DNA reviews: Ancient DNA. *Forensic Sci Med Pathol* 2007; 3: 221–225.
- Zupanič Pajnič I. Priporočila za molekularno genetsko identifikacijo žrtev vojnih pobojev v Sloveniji. V: Dežman J, ur. Poročilo Komisije vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikrin-

- tih grobišč 2005–2008. Ljubljana: Družina; 2008. p. 133–146.
34. Pääbo S, Poinar H, Serre D. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet* 2004; 38: 645–79.
 35. Edson SM, Ross JP, Coble MD, Parsons TJ, Barritt SM. Naming the dead—confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains. *Forensic Sci Reviews* 2004; 16: 64–89.
 36. Zupanič Pajnič I, Gornjak Pogorelc B, Balažič J, Zupanc T, Štefanič B. Highly efficient nuclear DNA typing of the World War II skeletal remains using three new autosomal short tandem repeat amplification kits with the extended European Standard Set of loci. *Croat Med J* 2012; 53: 17–23.
 37. Miloš A, Selmanović A, Smajlović L, Huel RLM, Katzmarzyk C, Rizvić A, Parsons JP. Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. *Croat Med J* 2007; 48: 486–493.
 38. Misner LM, Halvorson AC, Dreier JL, Ubelaker DH, Foran DR. The correlation between skeletal weathering and DNA quality and quantity. *J Forensic Sci* 2009; 54: 822–828.
 39. Davoren J, Vanek D, Konjhodžić R, Crews J, Huffine E, Parsons TJ. Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. *Croat Med J* 2007; 48: 478–85.
 40. Alonso A, Andelinović Š, Martin P. DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croat Med J* 2001; 42: 260–6.
 41. Tully G, Bär W, Brinkmann B, Carracedo A, Gill P, Morling N. Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. *Forensic Sci Int* 2001; 124: 83–91.
 42. Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Holland M. DNA commission of the International society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Int J Legal Med* 2000; 113: 193–196.
 43. Carracedo A, Bär W, Lincoln P, Mary W. DNA commission of the International society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int* 2000; 110: 79–85.
 44. Wilson MR, DiZinno JA, Polansky D, Replogle J, Budowle B. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *Int J Legal Med* 1995; 108: 68–74.
 45. Kalmar T, Bachrati CZ, Marcsik A, Rasko I. A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 67.
 46. Tamariz J, Voynarovska K, Prinz M, Caragine T. The application of ultraviolet irradiation to exogenous sources of DNA in plasticware and water for the amplification of low copy number DNA. *J Forensic Sci* 2006; 51: 790–794.
 47. Shaw K, Sesardić I, Bristol N, Ames C, Dagnall K, Ellis C, et al. Comparison of the effects of sterilisation techniques on subsequent DNA profiling. *Int J Legal Med* 2008; 122: 29–33.
 48. Vanek D, Saskova L, Koch H. Kinship and Y-chromosome analysis of 7th century human remains: Novel DNA extraction and typing procedure for ancient material. *Croat Med J* 2009; 50: 286–295.
 49. Rohland N, Hofreiter M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols* 2007; 2: 1756–1762.
 50. Qiagen Companies, EZ1 DNA Handbook, Vienna, 2004.
 51. Qiagen Companies, TissueLyser Handbook, Vienna, 2004.
 52. Applied Biosystems, Quantifiler™ human DNA quantification kit user guide, Foster City, 2003.
 53. Gross AM, Liberty AA, Ulland MM, Kuriger JK. Internal validation of the AmpFISTR Yfiler amplification kit for use in forensic casework. *J Forensic Sci* 2008; 53: 1–10.
 54. Applied Biosystems, AmpFISTR® NGM™ PCR amplification kit user guide, Foster City, 2009.
 55. Qiagen Companies, Investigator ESplex handbook, Vienna, 2010.
 56. Applied Biosystems, AmpFISTR MiniFiler™ PCR Amplification kit user guide, Foster City, 2007.
 57. Applied Biosystems, AmpFISTR YFiler™ PCR Amplification kit user guide, Foster City, 2005.
 58. Parson W, Parsons TJ, Scheithauer R, Holland MM. Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences: Application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. *Int J Legal Med* 1998; 111: 124–132.
 59. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.htm>
 60. Zupanc T, Štefanič B, Balažič J and Zupanič Pajnič I. Performance of the Human Quantifiler, the Investigator Quantiplex, and the Investigator ESplex kit for quantification and nuclear DNA typing of old skeletal remains. *Rom J Legal Med* 2013; in press.
 61. Montpetit SA, Fitch IT, O'Donnell PT. A simple automated instrument for DNA extraction in forensic casework. *J Forensic Sci* 2005; 50: 1–9.
 62. Valgren C, Wester S, Hansson O. A comparison of three automated DNA purification methods in forensic casework. *Forensic Sci Int: Genetics Supplement Series* 2008; 1: 76–77.
 63. Kishore R, Hardy WR, Anderson VJ, Sanchez NA, Buoncristiani MR. Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the biorobot EZ1 and biorobot M48. *J Forensic Sci* 2006; 51: 1055–61.
 64. Zupanič Pajnič I. A comparative analysis of the AmpFISTR Identifiler and PowerPlex 16 autosomal Short Tandem Repeat (STR) amplification kits on the skeletal remains excavated from Second World War mass graves in Slovenia. *Rom J Legal Med* 2013; 21(1): 73–78.