

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Gavrilo HADŽIĆ

**IDENTIFIKACIJA TELESNIH TEKOČIN
ČLOVEŠKEGA IZVORA S POMOČJO
BIOMARKERJEV INFORMACIJSKE RNA**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Gavrilko HADŽIĆ

**IDENTIFIKACIJA TELESNIH TEKOČIN ČLOVEŠKEGA IZVORA S
POMOČJO BIOMARKERJEV INFORMACIJSKE RNA**

MAGISTRSKO DELO

**IDENTIFICATION OF HUMAN BODY FLUIDS USING MESSENGER
RNA BIOMARKERS**

M. SC. THESIS

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je bilo opravljeno v Nacionalnem forenzičnem laboratoriju, Policija, MNZ, na Oddelku za biološke preiskave.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete z dne 28. 9. 2015 je bilo potrjeno, da kandidat Gavriilo Hadžić izpolnjuje pogoje za magistrski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje magisterija znanosti s področja genetike. Za mentorja je bila imenovana prof. dr. Katja Drobnič.

Komisija za oceno in zagovor

Predsednik: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Radovan KOMEL
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Član: prof. dr. Jože BALAŽIC
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za sodno medicino

Datum zagovora: 17. 3. 2016

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Gavriilo Hadžić

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Md
DK	UDK 577.2:343.983.2(043.3)
KG	identifikacija/telesne tekočine/mRNK/vaginalni izločki/MUC4/Staterin/Histatin 3/menstrualna kri/ MMP7/MMP11/laktobacili/ <i>Lactobacillus jensenii</i> / <i>Lactobacillus crispatus</i> /mucini/biomarkerji/informacijska RNK
AV	HADŽIĆ, Gavriilo, univ. dipl. mikrobiolog
SA	DROBNIČ, Katja (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehnoloških znanosti, področje genetike
LI	2016
IN	IDENTIFIKACIJA TELESNIH TEKOČIN ČLOVEŠKEGA IZVORA S POMOČJO BIOMARKERJEV INFORMACIJSKE RNA
TD	Magistrsko delo
OP	IX, 57 str., 10 pregl., 17 sl., 149 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V laboratoriju smo ugotavljali ali so biomarkerji mRNK specifični in zanesljivi, koliko jih potrebujemo za identifikacijo telesne tekočine, kako se označevalna gena MMP7 in MMP11, za ugotavljanje izvora menstrualne krvi, izražata tekom menstruacije, kakšno vlogo ima višina elektroforetskega signala (RFU) pri kapilarni elektroforezi za potrditev telesne tekočine, ali se da biomarkerje mRNK uporabimo na realnih forenzičnih vzorcih in ali lahko sočasno pri izolaciji DNK in RNK ugotovimo donorja bioloških sledi. S poskusi smo ugotovili, da sta mRNK biomarkerja STATH in HTN3 specifična in zanesljiva za ugotavljanje prisotnosti slin. Podobno velja za markerja MMP7 in MMP11, saj smo ju našli samo v menstrualni krvi in vaginalnih izločkih ter ugotovili, da se ne izražata enako ted potekom menstruacije. Biomarkerja MUC 4 in HBD1 smo našli tako v vzorcih slin, kot tudi v vaginalnih izločkih. Ugotovili smo, da za identifikacijo vaginalnih izločkov potrebno dokazati vsaj dva označevalca mRNK, pri čemer moramo vzorec vzporedno testirati še na prisotnost slin. Kadar ugotavljamo izvor biološke sledi je RFU pri kapilarni elektroforezi pomembna takrat, ko nimamo veliko mRNK označevalcev. Vsi testirani biomarkerji so uporabni za ugotavljanje izvora bioloških sledi na forenzičnih vzorcih, kjer večinoma dobimo tudi donorja telesne tekočine.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Md
DC	UDC 577.2:343.983.2(043.3)
CX	identification/body fluids/mRNA/vaginal secretions/MUC4/Statherin/Histatin 3/ menstrual blood/MMP7/MMP11/Lactobacillus/ <i>Lactobacillus</i> <i>jensenii/Lactobacillus crispatus</i> /biomarkers/messenger RNA
AU	HADŽIĆ, Gavriilo
AA	DROBNIČ, Katja (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Genetics
PY	2016
TI	IDENTIFICATION OF HUMAN BODY FLUIDS USING MESSENGER RNA BIOMARKERS
DT	M.Sc. Thesis
NO	IX, 57 p., 10 tab., 17 fig., 149 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	In the laboratory we tried to determine if the mRNA biomarkers are specific and reliable, how many mRNA biomarkers are needed to identify body fluid, how are MMP7 and MMP11 markers, for identification of menstrual blood, expressed during menstruation, and importance of electrophoretic signal (RFU) in identification of body fluids with capillary electrophoresis. We also tested if mRNA biomarkers are reliable for use in real forensic cases and if we can with simultaneous isolation of DNA and RNA, find a donor of the biological stain. Through experiments, we found that mRNA biomarkers STATH and HTN3 are specific and reliable to detect the presence of saliva. The same applies for the MMP7 and MMP11 markers, since we found them only in menstrual blood and vaginal secretion. We also found out that MMP7 and MMP11 markers are not expressed equally during menstrual period. MUC4 and HBD1 biomarkers were found in vaginal secretions and in some saliva samples. For identification of vaginal secretions we need to identify at least two of the mRNA biomarkers and test sample for the presence of saliva. Electrophoretic signal in capillary electrophoresis is important when we do not have a lot of mRNA markers. All tested biomarkers proved to be useful for identifying the origin of biological fluid in forensic samples and generally a donor of body fluid can be found.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
 1 UVOD	 1
1.1 POVOD ZA RAZISKAVO	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
1.3 NAMEN RAZISKAVE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 ANALIZE DNK	4
2.2 RIBONUKLEINSKA KISLINA (RNK)	4
2.2.1 Uravnavanje transkripcije (prepisovanja)	5
2.2.1.1 <i>cis</i> -delujoča regulatorna zaporedja	5
2.2.1.2 Transkripcijski regulatorni proteini	6
2.2.1.2.1 Transkripcijski aktivatorji	6
2.2.1.2.2 Represorji	6
2.2.2 Procesiranje mRNK	7
2.2.3 Urejanje mRNK	9
2.3 IDENTIFIKACIJA TELESNIH TEKOČIN S POMOČJO INFORMACIJSKE RNK	10
2.3.1 Stabilnost mRNK	10
2.3.2 Vaginalni izločki	11
2.3.2.1 Mucini	11
2.3.2.2 Vaginalna flora	11
2.3.3 Menstrualna kri	12
2.3.3.1 Matriksne metaloproteinaze	12
2.3.3 Slina	14
2.3.4 Semenska tekočina	15

2.3.5 Hišni gen	15
3 MATERIAL IN METODE	16
3.1 MATERIAL	16
3.1.1 Specifičnost in zanesljivost biomarkerjev mRNK	16
3.1.2 Specifičnost in zanesljivost biomarkerjev mRNK v vzorcih, pridobljenih po spolnih odnosih	16
3.1.3 Forenzični vzorci, pridobljeni pri preiskovanju resničnih kaznivih dejanj	17
3.2 METODE	18
3.2.1 RNK/DNK izolacija	18
3.2.2 Obratna transkripcija	19
3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR reakcija)	20
3.2.3.1 Enojna verižna reakcija s polimerazo	20
3.2.3.1 Sočasna PCR reakcija	22
3.2.4 PCR v realnem času	22
3.2.5 Kapilarna elektroforeza	22
4 REZULTATI	23
4.1 TKIVNA SPECIFIČNOST IN ZANESLJIVOST mRNK	23
4.2 SPECIFIČNOST IN ZANESLJIVOST mRNK MUC4, STATH in HTN3 V PENILNIH BRISIH	25
4.3 REZULTATI PREISKAV FORENZIČNIH VZORCEV	27
4.4 REZULTATI DNK PREISKAV	32
4.4.1 PCR v realnem času	32
4.4.1 Profili DNK	32
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	34
5.1 RAZPRAVA	34
5.2 SKLEPI	40
6 POVZETEK (SUMMARY)	41
6.1 POVZETEK	41
6.2 SUMMARY	42
7 VIRI	45
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Opis vzorcev za ugotavljanje specifičnosti in zanesljivosti biomarkerjev mRNK.	16
Preglednica 2: Sestava reakcijske mešanice za obratno transkripcijo 1 vzorca.	19
Preglednica 3: Program pomnoževanja, po katerem je potekala obratna transkripcija.	20
Preglednica 4: Sestava reakcijske mešanice za eno reakcijo PCR.	20
Preglednica 5: Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov in pričakovan produkt.	21
Preglednica 6: Specifičnost mRNK označevalcev GAPDH, MUC4, MMP7, MMP11, HBD1, STATH in HTN3 pri »čistih« vzorcih, pridobljeni od različni prostovoljcev.	23
Preglednica 7: Izražanje genov MMP7 in MMP11 med potekom tekom celotnega menstrualnega cikla.	24
Preglednica 8: Seznam penilnih brisov (mešanica bioloških sledi), odvzeti po različnih spolnih odnosih.	26
Preglednica 9: Dokazovanje mRNK označevalcev na realnih forenzičnih vzorcih.	28
Preglednica 10: Rezultati merjenja koncentracije DNK z metodo PCR v realnem času.	32

KAZALO SLIK

Slika 1: Procesiranje evkariontske mRNK (Cooper, 2000).	7
Slika 2: Proces izrezovanja z izrezovalno-povezovalnim kompleksom (ang. spliceosome) (Will in Lührmann, 2011).	8
Slika 3: Metaloproteinazni sistem (Zhang in Nothnick, 2005).	13
Slika 4: Delovanje histatina 5 na glivo <i>C. albicans</i> (Kavanagh in Dowd, 2004).	14
Slika 5: Postopek izolacije RNK in DNK.	18
Slika 6: Elektroferogram za gen GAPDH.	23
Slika 7: Elektroferogram za gen MMP7.	24
Slika 8: Elektroferogram za gen MMP11.	25
Slika 9: Elektroferogram za gen MMP7.	25
Slika 10: Elektroferogram za gen MUC4.	26
Slika 11: Elektroferogram za gen STATH.	27
Slika 12: Elektroferogram za gen HTN3.	27
Slika 13: Elektroferogram za Vag3plex (MYOZ1, CYP2B7P1 in MUC4).	29
Slika 14: Elektroferogram za <i>Lactobacillus jensenii</i> (LJEN) in <i>Lactobacillus crispatus</i> (LCRIS).	29
Slika 15: Elektroferogram za <i>Lactobacillus jensenii</i> (LJEN) in <i>Lactobacillus gasseri</i> (LGAS).	29
Slika 16: Elektroferogram za gen HBD1.	30
Slika 17: Okvir z ročaji za višino RFU signalov iskanih transkriptov.	31

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

UKC	Univerzitetni klinični center
NFL	Nacionalni forenzični laboratorij
PSA	Prostate specifičen antigen
RSID™	Hitri potrditveni test (ang. Rapis stain Identification)
STR	Kratke tandemske ponovitve (ang. short tandem repeats)
MUC4	Mucin 4
LJEN	<i>Lactobacillus jensenii</i>
LCRIS	<i>Lactobacillus crispatus</i>
LGAS	<i>Lactobacillus gasseri</i>
MYOZ1	Myozenin-1
CYP2B7P1	Cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 7 pseudogene 1
HBD1	Humani β -defenzin 1
STATH	Staterin
HTN3	Histatin
MMP	Matriksne metaloproteinaze
PRM	Protamin
TGM4	Transglutaminaza 4
SEMG1	Semenogelin

1 UVOD

1.1 POVOD ZA RAZISKAVO

Posilstvo. Dekle, poimenujmo jo Sabina, je nekega petkovega večera s prijateljicami odšla na zabavo v park Tivoli. Bila je družba več ljudi. Nekateri so popivali in plesali, drugi so samo sedeli in se pogovarjali. Tekom večera sta dva fanta opazovala Sabino. Sabina je enega izmed njiju bežno poznala, saj se je večkrat znašel v družbi. Kasneje sta jo začela zabavati in se z njo postopoma oddaljevati od samega dogajanja. Naenkrat se je Sabina znašla v temačnem predelu parka, malo pijana ter razigrana. Poljubila je prvega fanta, in sicer fanta, ki ji je bil všeč že nekaj časa. Ko je videl to drugi fant je prišel bližje in tudi on hotel poljub. Sabina se je uprla in rekla, da drugega ne želi, da je vse skupaj ena velika napaka in hotela pobegniti. V tistem trenutku jo je prvi fant zagrabil za vrat in jo udaril. Prestrašena je padla po tleh in začela jokati. Nanjo je legel prvi fant, pri tem pa jo je drugi držal za roke. Fant, ki je ležal na njej ji je dvignil krilo, slekel spodnje hlače in vtaknil svoj penis vanjo. Da se ne bi branila sta jo večkrat udarila po glavi, tako da se je umirila. Nadaljevala sta s posilstvom, pri tem pa sta se menjavala, bila tudi groba, da je prišlo do krvavitve iz nožnice. Pri vsem tem sta pazila, da ne ejakulirata v Sabino, temveč sta ejakulirala na travo. Ko sta končala, sta pobegnili in pustila Sabino. Čez čas je Sabina prišla nazaj do družbe, vsa pretepena in zbegana. Prijatelji so jo videli in takoj poklicali policijo in reševalce.

Na kraj so prišli reševalci in policija. Policija je naredila zapisnik, opravila razgovor z vsemi, vmes pa so Sabino odpeljali na urgentni blok UKC Ljubljana. V UKC so jo poslikali in odvzeli vaginalni bris ter biološke sledi izpod nohtov. Pobrli so tudi njene obleke. Policija je prišla do informacij, kdo sta potencialna storilca. Oglasili so se pri njima na domu. Odvzeli so jima penilne brise ter pobrali njuna oblačila. Vse skupaj so poslali v Nacionalni forenzični laboratorij (v nadaljevanju NFL). V NFL so na poslanih oblačilih pričeli z iskanjem bioloških sledi.

Iskanje biološke sledi poteka s prostim očesom ali uporabo forenzičnega vira svetlobe, sama identifikacija pa z uporabo različnih metod. Konvencionalne metode za določanje vrste biološkega izvora oziroma identifikacijo biološke sledi delimo na encimske, imunološke in morfološke ter fizikalne metode (Virkler in Lednev, 2009). Nekatere med njimi so preliminarne ali nespecifične kot na primer test z luminolom, ki se uporablja kot presejalni test, s katerim ugotavljamo najverjetnejšo sled krvi. Druge so potrditvene metode, kot sta prepoznavanje spermijev z mikroskopskim pregledom ali ugotavljanje prisotnosti človeške krvi z imunokromatografskim testom (Allery in sod., 2001). Na tržišču je trenutno dostopnih kar nekaj komercialnih preliminarne in potrditvenih testov za identifikacijo krvi, semenske tekočine in sline. V splošnem laboratoriji za preliminarno določanje krvi uporabljajo t. i. reagenčne lističe Hemastix, ki so bili primarno razviti za potrjevanje prisotnosti ali odsotnosti krvi v urinu. Test temelji na peroskidazi-podobni aktivnosti hemoglobina, pri katerem je diizopropilbenzen dihidroperoksid substrat in 3,3',5,5'-tetrametilbenzidine (TMB) reportersko barvilo. Brezbarvni TMB se v prisotnosti hemoglobina v vzorcu obarva, listič pa spremeni barvo iz rumene v modrozeleno (Poon in sod., 2009). Slabosti omenjenega testa so, da ni človeško specifičen in daje lažno pozitivne rezultate z nekaterimi drugimi oksidirajočimi substancami. Poleg omenjenega nespecifičnega testa lahko za določevanje krvi uporabimo še druge potrditvene teste kot je

Hexagon Obti test. Test temelji na dokazovanju humanega oz. človeškega hemoglobina (hHb) v vzorcu. Če je v vzorcu prisoten hHb, se nanj veže monoklonsko anti-hHb protitelo, ki je specifično za hHb (Vozelj, 2000). Nastali imunokompleks (kompleks protitelesa in antigena) na podlagi kapilarnega efekta potuje do testne cone, kjer ga "ujame" drugo, tokrat imobilizirano anti-hHb protitelo. Nad določeno koncentracijo hHb v vzorcu ($0.05 \mu\text{g/ml}$) v testni coni postane vidna rdeča ali modra (odvisno od proizvajalca) črtica, ki je znak pozitivne reakcije. Slabost omenjenega imunološkega testa je, da ne razlikuje med tipi človeške krvi. Slednje pomeni, da ne omogoča razlikovanja med menstrualno krvjo in venozno/arterijsko krvjo. Omenjeni test pokaže tudi lažno pozitivne rezultate s krvjo primatov (Hermon in sod., 2003), kar pa v srednjeevropskem prostoru običajno ni problem.

Pri seksualnih deliktih pogosto iščemo sledi semenske tekočine. Določevanje semenske tekočine temelji na mikroskopski preiskavi, pri kateri iščemo spermije, ali pa se prisotnost semenske tekočine ugotavlja z nespecifičnim encimskim (Phosphatesmo KM) ali potrditvenim imunokromatografskim (komercialno ime PSA Check 1) testom. Slednji deluje po podobnem principu kot prej opisani Hexagon Obti test. Poleg PSA testa poznamo še imunokromatografski test za ugotavljanje semenske tekočine, in sicer RSID™-semen (Rapid Stain Identification). RSID™-semen test je leta 2006 na tržišču predstavil eden od zasebnih forenzičnih laboratorijev, Independent Forensics. Omenjeni test namesto PSA proteina, na katerem temelji PSA Check test, ugotovi prisotnost semenogelina, ki se nahaja v semenski tekočini (Lundwall in sod., 2002; Balk in sod., 2003; Laffan in sod., 2011).

Poleg ugotavljanja krvi in semenske tekočine je dokazovanje sline še posebno pomembno pri tistih kaznivih dejanjih, ko je treba dokazati, da sled na telesu izvira iz sline in ne iz drugih bioloških sledi. Trenutno se slina najpogosteje ugotavlja z enostavnim nespecifičnim komercialnim testom Phadebas®. Test temelji na aktivnosti encima α -amilaza, ki škrob hidrolizira v maltozo. Prav to hidrolizo škroba v maltozo uporabljamo za potrditev sline. Reagentni listi Phadebas® so prepojeni s škrobnimi mikrozrci, na katere je vezano modro barvilo. V prisotnosti amilaze pride do razgradnje škroba, ob tem pa se sprost vodotopno modro barvilo. Na beli podlagi testnega lista Phadebas® na mestu sline nastane moder madež (Hedman in sod., 2001). S podobnimi težavami, kot že pri prej omenjenih nespecifičnih testih, se srečujemo tudi pri dokazovanju sline.

Omejitve večine konvencionalnih testov so nizka specifičnost, uničenje vzorca, nestabilnost testiranih proteinov, identifikacija le enega tipa biološke sledi naenkrat ali nekompatibilnost z nadaljnjimi genetskimi metodami (Virkler in Lednev, 2009). Problem se pojavi, kadar pri posilstvu ne najdemo semenske tekočine, osumljenec pa nam je znan. V tem primeru bi bilo zelo zaželeno, da bi lahko dokazali vaginalne izločke bodisi na penisu ali na spodnjih hlačah osumljenca, saj včasih samo profiliranje DNK ni zadostno. Slednje pomeni, da bo osumljeni spolnega nadlegovanja svojega otroka težje pojasnil od kod so prišli vaginalni izločki na njegove spodnje hlače, saj samo najdba DNK otroka na njegovih spodnjih hlačah včasih ni zadosten dokaz. Prav zato, ker trenutno ni na voljo klasičnih potrditvenih encimskih ali pa imunoloških testov za identifikacijo vaginalnih izločkov, smo se v NFL odločili za identifikacijo bioloških sledi s pomočjo biomarkerjev informacijske RNK (mRNK).

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

V naši raziskavi preizkušamo več hipotez, in sicer smo predpostavili:

1. Da so biomarkerji mRNK specifični in zanesljivi.
2. Da sta potrebna vsaj dva biomarkerja mRNK za identifikacijo telesne tekočine.
3. Da se označevalna gena MMP7 in MMP11 (za ugotavljanje menstrualne krvi) ne izražata enako med potekom menstruacije.
4. Da ni potrebno določiti minimalne višine elektroforetskega signala (RFU) pri kapilarni elektroforezi za potrditev telesne tekočine.
5. Da so biomarkerji mRNK uporabni za določevanje izvora telesnih tekočin človeškega izvora na realnih forenzičnih vzorcih.
6. Da pri sočasni izolaciji DNK in RNK lahko ugotovimo profil DNK posameznika, se pravi donorja biološke sledi oz. telesne tekočine.

1.3 NAMEN RAZISKAVE

Rezultati te magistrske naloge lahko podprejo uporabo biomarkerjev mRNK na realnih forenzičnih vzorcih, podajo okvirne informacije o številu potrebnih biomarkerjev mRNK za določitev telesne tekočine (vaginalni izločki, menstrualna kri in slina) ter pokažejo občutljivost in specifičnost biomarkerjev. Rezultati bodo podali informacijo o ustreznosti uporabljenih označevalcev ali njihovi neustreznosti. V slednjem primeru se odpira novo iskanje kombinacij mRNK označevalcev za določitev izvora telesne tekočine.

S pravo izbiro biomarkerjev mRNK bomo metodo vpeljali v rutinsko delo laboratorija, kar bo pripomoglo pri sami rekonstrukciji in določitvi kaznivega dejanja.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ANALIZE DNK

Vsaka človeška celica, razen trombocitov in zrelih eritrocitov, vsebuje DNK (deoksiribonukleinsko kislina), ki je organizirana v kromosom in je v jedru celice (Sackmann, 1995). Njeno zgradbo sta leta 1953 prva opisala Watson in Crick, in sicer da je molekula DNK dvojna vijačnica. Praviloma ima posameznik enako DNK v vseh svojih celicah, vendar različno od drugih ljudi, celo bližnjih sorodnikov. Izjema so enojajčni dvojčki, ki imajo enako DNK. DNK je nukleinska kislina, ki nosi zapis genetske informacije vseh živih organizmov in predstavlja informacijsko osnovo za njihovo zgradbo, razvoj in delovanje. Sestavljajo jo nukleotidi, katerih ogrodje je sestavljeno iz sladkorja, fosfatne skupine in baze (Lewin, 2000). Značilnost človeške jedrne DNK je, da v določenih delih vsebuje različna ponavljajoča se zaporedja nukleotidov, ki v večini primerov predstavljajo zelo polimorfna področja (Tautz, 1993; Ellegren, 2000; Schlötterer, 2000; Butler, 2011). V to skupino hipervariabilnih polimorfnih področij sodijo tudi mikrosateliti ali kratke tandemske ponovitve, ki jih označujemo s kratico STR (angl. short tandem repeats). So v nekodogenih regijah DNK, torej se ne prepisujejo v proteine oz. RNK in so po človeškem genomu raztresene povsem naključno. Mikrosateliti zavzemajo približno 3 % celotnega človeškega genoma (Lander in sod., 2011). STR označevalci so razpršeni po celotnem genomu in se pojavijo na vsakih 10.000 nukleotidov, vendar niso vsi STR lokusi primerni za razlikovanje med posamezniki (Edwards in sod., 1991; Collins in sod., 2003; Subramanian in sod., 2003). Da bi lahko z dovolj veliko verjetnostjo trdili, da biološka sled s kraja dejanja izvira od določene osebe, se v forenzičnih laboratorijih običajno pomnožuje med 10 in 23 področji STR. Ugotavljanje, katera oseba je pustila sled na kraju dejanja temelji na primerjalni metodi. Na podlagi primerjave profila DNK vzorca sledi s kraja dejanja s profilom DNK primerjalnega vzorca osumljene osebe, lahko potrdimo, da sled, najdena na kraju dejanja pripada, tej dotični osebi (Drobnič, 2004).

2.2 RIBONUKLEINSKA KISLINA (RNK)

Vsako tkivo oz. celica potrebuje za svoje delovanje določene proteine. Funkcija oz. informacija proteina je zapisana v DNK v celici. Sinteza proteina v celici poteka s pomočjo kompleksnega prepisovalnega aparata, kjer je zelo pomembna informacijska RNK (v nadaljevanju mRNK). Tako sinteza proteina poteka v smeri DNK → RNK → protein. Vsaka celica s specifičnimi proteini nadzoruje, kateri geni se v nekem trenutku izražajo in kateri ne (Lewin, 2000). Tako pri evkariontih kot tudi pri prokariontih je prva stopnja genskega izražanja prepis ali transkripcija DNK v RNK. Pri evkariontskih celicah se RNK spreminja na različne načine, npr. z izrezovanje intronov, tako da celica dobi transkript v funkcionalni obliki. V celicah imajo različni tipi RNK različne vloge. Informacijska RNK (mRNK) služi kot matrica za sintezo proteinov, ribosomalna RNK (rRNK) in prenašalna RNK (tRNK) pa sodelujeta pri prevajanju mRNK (translacija). Pri evkariontih pa nekatere manjše RNK sodelujejo pri uravnavanju izražanja genov.

Encim odgovoren za sintezo RNK, je RNK polimeraza, ki katalizira polimerizacijo ribonukleozid 5'-trifosfatov (NTP) tako kot narekuje DNK zaporedje. Veriga RNK vedno nastaja v smeri od 5' proti 3' koncu. Pri bakteriji *E. coli* je RNK polimeraza kompleksen

encim sestavljen iz več polipeptidnih verig. Zaporedje DNK, kamor se veže polimeraza RNK, da prične s transkripcijo gena, imenujemo promotor (Cooper, 2000). Da pa lahko bakterijska RNK polimeraza prepozna promotorje, potrebuje sigma faktorje, σ . V splošnem velja, da so σ faktorji podvrženi "tekmovanju" za vezavo na jedro RNK polimeraze (Boucher in Schurr, 2000). Bakterija ima več tipov σ faktorjev, ki se aktivirajo pri različnih razmerah, prepoznavajo različne razrede promotorjev in narekujejo transkripcijo za celične potrebe (Boucher in Schurr, 2000; Brody in sod., 2001). Vzdrževalni σ faktor (σ^{70} pri *E. coli* in σ^A pri *B. Subtilis*) je potreben za večino transkripcij med rastjo bakterij. Ostali σ faktorji pa delujejo kot glavni regulatorji pri odgovoru na stres, vstopu v stacionarno fazo, rasti bička in sporulacijo (Buck in sod., 2000).

Za razliko od prokariotske celice, kjer se geni prepisujejo z eno RNK polimerazo, imamo pri evkariontskih celicah več polimeraz RNK. Slednje se morajo tudi povezati z več različnimi proteini, da lahko prične transkripcijo (Cooper, 2000). Roeder in Rutter (1969) sta poročala, da ima evkariontska celica tri različne RNK polimeraze (RNK pol). Gene, ki nosijo zapis za proteine, prepisuje RNK polimeraza II (RNK pol II), tako da nastane mRNK. RNK polimeraza II je encim, ki prepozna več tisoč promotorjev, ki imajo različna zaporedja. Večina promotorjev RNK pol II ima nekaj skupnih značilnosti, in sicer TATA box (konsenzno zaporedje TATAAA) in Inr zaporedje (začetno zaporedje) (Sentenac, 1985). Ribosomalne RNK (rRNK) in prenašalnih RNK (tRNK) se prepisujejo s pomočjo RNK polimeraze I in III. RNK polimeraza I je odgovorna za sintezo transkripta, imenovanega preribosomalna RNK, ki je predhodnik za 18S, 5.8S in 28S rRNK. RNK polimeraza III pa je odgovorna za sintezo prenašalne RNK (tRNK), 5S rRNK in nekaj manjših RNK (Nelson in Cox, 2004). RNK polimeraza II za svoje delovanje, se pravi prepisovanje, potrebuje tudi določene t. i. transkripcijske faktorje (TF), tako da nastane funkcionalen transkripcijski kompleks, ki prepisuje DNK v mRNK (Roeder in sod., 1976).

2.2.1 Uravnavanje transkripcije (prepisovanja)

Pri evkariontih je transkripcija nadzorovana z določenimi proteini, ki se vežejo na specifična regulatorna zaporedja in narekujejo delovanje RNK polimeraze. Uravnavanje genskega izražanja je kombinacija delovanja več različnih transkripcijskih regulatornih proteinov.

2.2.1.1 *cis*-delujoča regulatorna zaporedja

cis-delujoča regulatorna DNK zaporedja so bila pri sesalcih opisana že leta 1981 (Banerji in sod., 1981; Moreau in sod., 1981). Geni, ki jih prepiše RNK-polimeraza II, imajo dva jedrna promotorja, TATA box in Inr-zaporedje, ki služita kot specifični vezavni mesti za transkripcijske faktorje. Ostala *cis*-delujoča regulatorna zaporedja služijo kot vezavna mesta za širok spekter regulatornih faktorjev, ki uravnavajo izražanje posameznih genov. Ta zaporedja se po navadi nahajajo navzgor od TATA box-a. Dve zelo pogosti zaporedji sta CCAAT in GGGCGG, imenovani GC box (Yean in Gralla, 1996). V nasprotju z omenjenimi zaporedji so nekatera pomožna zaporedja mnogo dlje od transkripcijskega začetnega mesta (včasih več kot 10 kilobaz). Ta zaporedja imenujemo »ojačevalci« (»enhancers«). Ojačevalci, tako kot promotorji, delujejo tako, da vežejo prepisovalni dejavnik, ki nato uravnava RNK-polimerazo. To je možno, ker DNK tvori med

promotorjem in ojačevalcem zanko. S tem je omogočeno, da se transkripcijski faktor poveže z oddaljenim

ojačevalcem in tako lahko skupaj delujeta na RNK polimerazo (Cooper, 2000). Vezava specifičnega transkripcijskega regulatornega proteina z ojačevalcem uravnava gensko izražanje med razvojem in diferenciacijo. Pomembno dejstvo je tudi, da ojačevalci po navadi vsebujejo multifunkcionalne elemente, ki vežejo različne transkripcijske regulatorne proteine. Tak primer najdemo pri imunoglobulinskem ojačevalcu (Van Ness in Fulton, 1994).

2.2.1.2 Transkripcijski regulatorni proteini

2.2.1.2.1 Transkripcijski aktivatorji

Transkripcijski aktivatorji, kot npr. specifični protein 1 (Sp1), se vežejo na regulatorno DNK zaporedje in spodbuja transkripcijo (Kadonaga in Tjian, 1986). Načeloma so sestavljeni iz DNK vezavne domene (DBD) in aktivacijske domene (AD). DBD cilja na specifično vezavno mesto v promotorju ali ojačevalni regiji gena, AD pa sodeluje pri transkripcijski iniciaciji (Kadonaga, 2004). Mnogo DBD teh proteinov je sorodnih. Domene, imenovane cinkovi prsti, vsebujejo ponovitve cisteinskih in histidinskih ostankov, ki vežejo cinkove ione in se pri tem zvijejo v »zankasto« zgradbo (»prst«), ki veže DNK. Takšen primer najdemo pri steroidnem hormonskem receptorju, ki uravnava gensko transkripcijo kot odgovor na hormone kot sta npr. estrogen in testosteron (Evans, 1988). Pri evkariontih so med transkripcijskimi aktivatorji tudi proteini tipa vijačnica-zavoj-vijačnica, kot npr. homeodomenski proteini, ki imajo pomembno vlogo pri uravnavanju genskega izražanja med embrionalnim razvojem. Dve ostali družini DNK-vezavnih domen sta levcinska zadruga in proteini tipa vijačnica-obrat-vijačnica, ki vsebujejo DNK-vezavno domeno (Lewin, 2000).

2.2.1.2.2 Represorji

Transkripcijske represorje sesalcev lahko razdelimo v dve skupini, in sicer pasivne represorske proteine in aktivne represorske proteine (Cowell, 1994). Pasivni represorji nimajo intrinzične represivne aktivnosti ali prenosne represorske domene. Ti represorji onemogočajo sintezo RNK tako, da "tekmujejo" s transkripcijskimi aktivatorji za DNK vezavno mesto, tako da tvorijo neaktivne heterodimere s transkripcijskimi aktivatorji. Tako je onemogočena vezava transkripcijskega aktivatorja na DNK zaporedje. Pasivni represorski proteini se lahko vežejo tudi s koaktivatorji, ki so potrebni za transkripcijske aktivatorske proteine. Njihov način delovanja je preko DNK ali preko protein-protein interakcije (Thiel in sod., 2004).

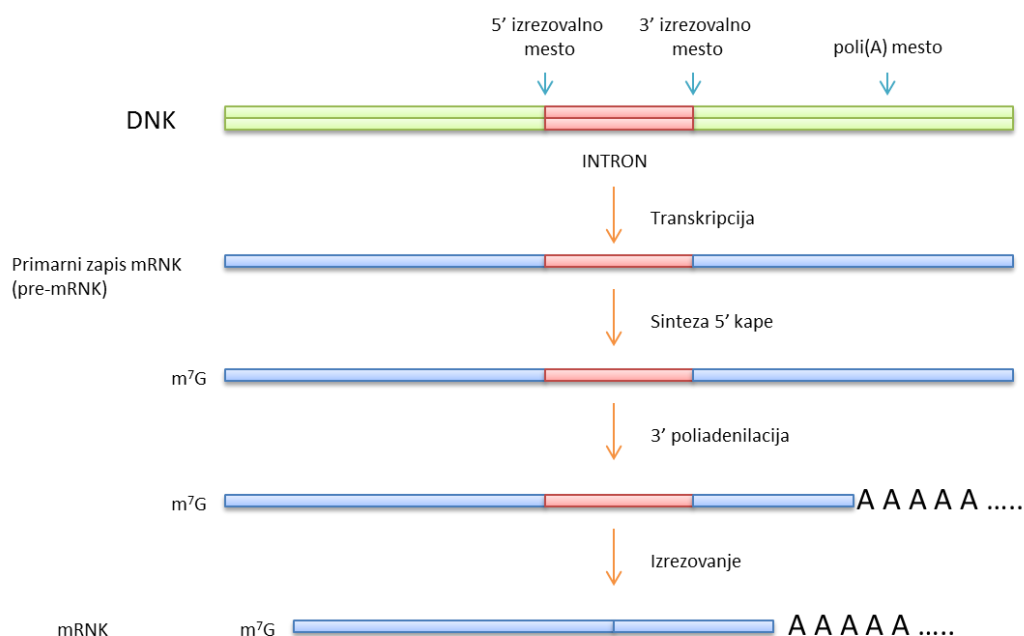
Za razliko od pasivnih represorskih proteinov imajo aktivni represorski proteini intrinzično represorsko aktivnost, saj so usmerjeni v reorganizacijo kromatina. Takšen tip transkripcijske represije je neodvisen od aktivatorja in deluje na daljše razdalje. Poznamo dva načina delovanja aktivnih represorskih proteinov, in sicer transkripcijska represija preko deacetilacije histonov in utišanje genov preko metilacije histonov in tvorbe heterokromatina (Thiel in sod., 2004; Shilatifard, 2006). Represorji imajo pomembno

vlogo, saj preprečujejo ekspresijo oz. izražanje tkivno specifičnih genov v neprimernih celičnih tipih.

2.2.2 Procesiranje mRNK

Pri evkariontih se mRNK sintetizirana v jedru celice in preden se lahko uporabi kot matrica za sintezo proteina, se mora transportirati iz jedra v citoplazmo celice. Primarni transkript (pre-mRNK) je podvržen mnogim modifikacijam na obeh koncih molekule in odstranjevanju intronov v sredini.

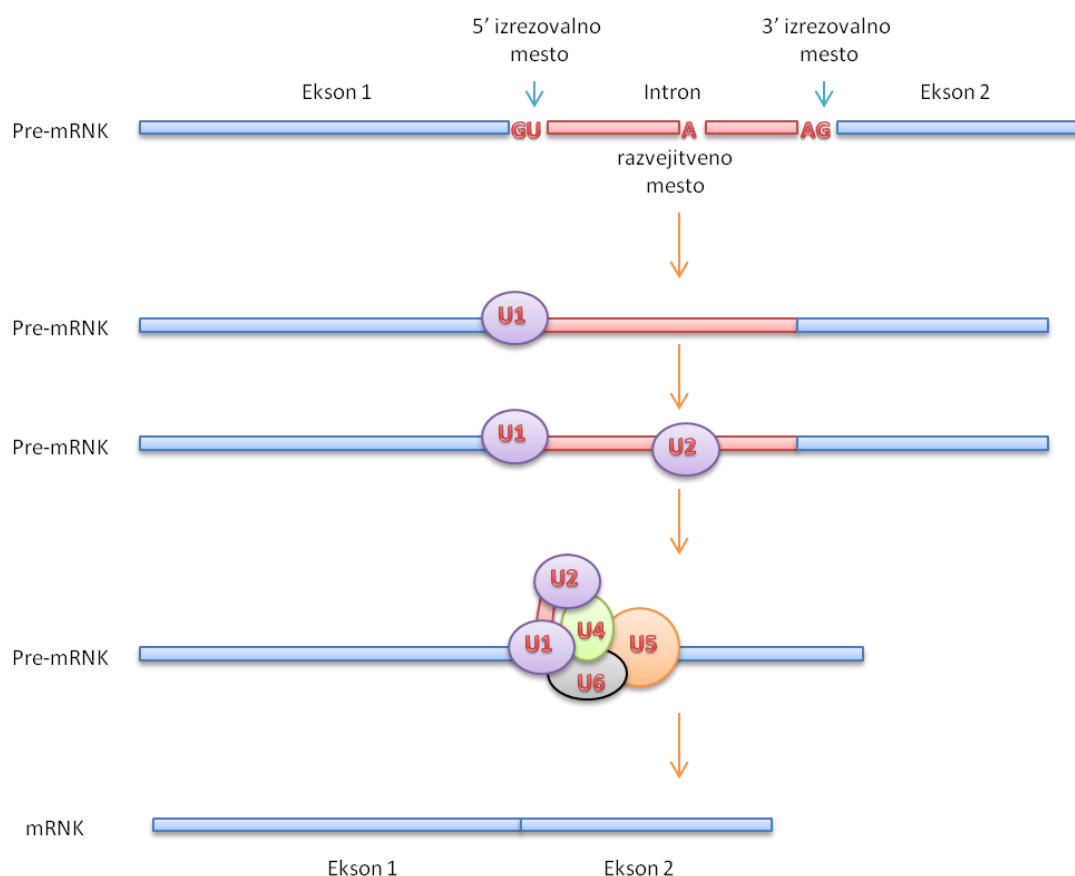
5' konec primarnega zapisa mRNK (pre-mRNK) se spremeni takoj po sintezi tako, da se doda 7-metilgvanozinska kapa (m⁷G). Sinteza kape se prične z dodatkom GTP na 5' konec pre-mRNK. Sledi metilacija gvanozina, kjer se metilne skupine dodajo na G in na ribozo (na enega ali dva nukleotida RNK verige) (Slika 1). 5' kapa poravnava evkariontsko mRNK na ribosom med potekom translacije (Wei in Moss, 1977). Skoraj vsaka mRNK vsebuje močno konzervativno signalno poliadenilacijsko zaporedje, heksanukleotid AAUAAA. Nahaja se 10-30 nukleotidov navzgor od poliadenilacijskega mesta. Poleg AAUAAA so še navzgor in navzdol od tega mesta manj konzervativna zaporedja, ki sodelujejo pri poliadenilaciji. Omenjena zaporedja prepozna kompleks proteinov, med katerimi je tudi endonukleaza, ki reže verigo RNK in poliadenilat polimeraza, ki dodaja poli(A) rep, dolg približno 200 nukleotidov. Poliadenilacija signalizira konec transkripcije, ki se pojavi nekaj sto nukleotidov navzdol od poli(A) repa. Proteini, ki katalizirajo poliadenilacijo, so povezani z RNK polimerazo II, saj omogočajo vez med transkripcijo in tvorbo 3' konca mRNK (Colgan in Manley, 1997).



Slika 1: Procesiranje evkariontske mRNK. Postopek vključuje modifikacijo 5' konca, kjer RNK terminalna transferaza odstrani končni fosfat. Gvanililtransferaza doda GMP (iz GTP). Na dodani G metiltransferaza doda metil na mesto N7. Poteče lahko še metilacija tako, da se doda metilna skupina na ribozo prvega ali drugega nukleotida mRNK. S tem je zagotovljena stabilnost mRNK, njen izvoz iz jedra, izrez 5'-intron in pospešena translacija (Cooper, 2000).

Pri evkariontih je večina mRNK poliadeniliranih. Namreč poli(A) repi imajo pomembno vlogo pri uravnavanju in stabilnosti RNK. Prav tako ima poliadenilacija pomembno vlogo pri zgodnjem embrionalnem razvoju, saj dolžina poli(A) repa uravnava prepisovanje. V neoplojenem jajčecu je mnogo neprepisanih mRNK s kratkimi poli(A) repi, približno dolgimi od 30 do 50 nukleotidov. Oploditev jajčeca spodbuja podaljševanje poli(A) repov neprepisanih mRNK. S tem se prične njihova translacija in sinteza proteinov, potrebnih za zgodnji embrionalni razvoj (Rosenthal in Ruderman, 1987; Wormington, 1993; Vassalli in Stutz, 1995).

Najbolj pomembna sprememba pre-mRNK je odstranjevanje intronov z izrezovanjem. Večina evkariontskih genov ima poleg kodirajočih zaporedij tudi nekodirajoča zaporedja, introne. Proces izrezovanja se izvede z izrezovalno-povezovalnim kompleksom (ang. spliceosome). Izrezovalni-povezovalni kompleks je sestavljen iz več 100 proteinov in petih malih jedrnih RNP delcev (snRNP) (Kramer, 1996). Prva stopnja pri nastanku izrezovalno-povezovalnega kompleksa je vezava U1 snRNP na 5' izrezovalno mesto pre-mRNK. Prepozna 5' izrezovalnega mesta vključuje povezovanje med 5' izrezovalnim mestom konsenznega zaporedja in komplementarnim zaporedjem na 5' koncu U1 snRNP. Nato se na mesto razvejitve veže U2 snRNP. Sledi vezava kompleksa U4/U6 in U5 snRNP z izrezovalno-povezovalnim kompleksom, pri čemer je U5 snRNP povezan s 5' in 3' izrezovalnim mestom (Slika 2) (Nilsen, 2000).



Slika 2: Proces izrezovanja z izrezovalno-povezovalnim kompleksom (ang. spliceosome) (Will in Lührmann, 2011).

Poleg procesiranja pre-mRNK z izrezovalno-povezovalnim kompleksom, se lahko celica odloči tudi, katere eksone v genu bo uporabila za sintezo določenega proteina. Alternativno izrezovanje omogoča genu, povečanje svoje kodirajoče zmogljivosti, tako da je omogočena sinteza različnih strukturnih in funkcionalnih izooblik proteina. Načeloma imajo alternativni eksoni optimalne izrezovalne signale in njihova vključitev je uravnavana s trans-delujočimi faktorji, ki prepoznajo ureditev pozitivnih (izrezovalni ojačevalci) in/ali negativnih (izrezovalni utiševalci) cis-delujočih zaporednih elementov, kateri so lahko eksonski ali intronski (Smith in Valcarcel, 2000; Cáceres in Kornblihtt, 2002).

Pomembno vlogo imajo močno ohranjene, s serinom in argininom bogate proteinske družine, SR proteini (Graveley, 2000). SR proteini imajo modularno strukturo, sestavljeno iz ene ali dveh kopij RNK-prepoznavnega motiva (RRM), ki določa specifičnost RNK vezave. RRM sledi C-terminalna domena, ki spreminja serinske in argininske ostanke (RS domena). Vezava SR proteinov na eksonske izrezovalne ojačevalce (ESE) spodbudi rekrutiranje U2AF na polipirimidinski pas (poli Y) in aktivacijo sosednjega 3' izrezovalnega mesta. Druga možnost pa je, da ti proteini olajšajo izrezovanje z rekrutiranjem koaktivatorjev ali pa onemogočajo negativno aktivnost hnRNP proteinov, ki prepoznajo eksonske izrezovalne utiševalne elemente (ESS) (Blencowe, 2000; Hastings in Krainer, 2001).

Za različne vzorce izrezovanja med razvojem ali pa v različnih tkivih naj bi bile odgovorne razlike v aktivnosti in količini splošnih izrezovalnih faktorjev in/ali specifičnih genskih izrezovalnih regulatorjev. Prav tako poti signalne transdukcije lahko modulirajo izbiro alternativnega izrezovalnega mesta z uravnavanjem koncentracije, z aktivnostjo in/ali subcelularno lokalizacijo izrezovalnih regulatornih proteinov (Stamm, 2002).

Znan je tudi mehanizem uravnavanja alternativnega izrezovanja preko transkripcijskega sistema in vključuje delovanje RNK polimeraze II (Roberts in sod., 1998; de la Mata in sod., 2003). Npr. zaradi počasnega delovanja RNK polimeraze II in/ali prisotnosti notranjih transkripcijskih pavznih mest pride do vključitve alternativnega eksona, ki skriva šibko 3' izrezovalno mesto. Ko pa je ta ista pre-mRNK prepisna z močno aktivno RNK polimerazo II, to šibko alternativno 3' izrezovalno mesto ne more tekmovati z močnejšim 3' navzdol izrezovalnim mestom. Posledica tega je, da pride do izpustitve alternativnega eksona (Sanford in Cáceres, 2004).

2.2.3 Urejanje mRNK

Urejanje RNK se nanaša na procesiranje RNK (drugačno od izrezovanja), pri čemer pride do spremembe protein kodirajočega zaporedja nekaterih mRNK. Najbolje preučevan primer urejanja RNK pri sesalcih je apolipoprotein B, ki prenaša lipide v krvi. Posledica tkivno specifičnega RNK urejanja je nastanek dveh oblik apolipoproteina B (Apo-B). Pri ljudeh protein Apo-B100 (4536 aminokislin) nastaja v jetrih s translacijo neurejene RNK. Za razliko od nastanka Apo-B100 v jetrih, pa v črevesju nastaja krajši Apo-B48 (2125 aminokislin). Namreč Apo-B48 se prepisuje iz urejene RNK, pri čemer pride do spremembe C v U. Ta substitucija povzroči spremembo kodona za glutamin (CAA), ki ga najdemo v neurejeni RNK, v zaključni ali terminacijski kodon (UAA) v urejeni RNK. Posledica tkivno specifičnega urejanja RNK Apo-B je tako v obliki in funkciji. Apo-B100 nastaja v jetrih in je odgovoren za prenos lipidov po krvnem obtoku, medtem ko Apo-B48

nastaja v črevesju in je odgovoren za absorpcijo prehranskih lipidov (Cooper, 2000; Davidson in Shelness, 2000).

2.3 IDENTIFIKACIJA TELESNIH TEKOČIN S POMOČJO INFORMACIJSKE RNK

Vsaka celica s specifičnimi proteini nadzoruje, kateri geni se v nekem trenutku izražajo in kateri ne (Lewin, 2000). Povedano drugače, celica ima nekatere samo zanjo specifične proteine, se pravi, samo zanjo v določenem trenutku specifične mRNK, v primerjavi z ostalimi celicami, ki imajo svoj nabor molekul mRNK. Prav ta skupina molekul mRNK, ki nastajajo v določeni celici v določenem času, je temelj za identifikacijo bioloških sledi.

Pri iskanju tkivno specifičnih označevalnih genov je treba najprej identificirati protein, ki se izraža samo v določenem tipu celice oziroma je njegovo izražanje občutno višje kot v drugih. Ko ugotovimo, da je določen protein prisoten samo v točno določeni celici ali pa je prisoten v večji količini kot v drugih, mu določimo aminokislinsko zaporedje. Na podlagi aminokislinskega zaporedja proteina lahko ugotovimo nukleotidno zaporedje mRNK molekule in tudi DNK molekule oz. cDNK (Cooper, 2000).

Izhodiščni material za pripravo cDNK je izolirana mRNK iz preučevanega tkiva. Tipična sesalska celica vsebuje 20 pg RNK, od tega je približno 1,5 % mRNK. Iz nekaterih tkiv lahko izoliramo mRNK neposredno, v nekaterih primerih je potrebna še vmesna stopnja izolacije celotne celične RNK. Iz vzorca celotne celične RNK izoliramo mRNK z afinitetno kromatografijo na oligo-dT celulozi, pri čemer izkoriščamo lastnost večine evkariontskih molekul mRNK, da so poliadenilirane. V zadnjem času pa se zelo pogosto uporabljajo filtri iz steklenih vlaken v namenskih mikrocentrifugirkah. Izolirano mRNK pozneje v postopku prepišemo v cDNK. Specifičnost tkivno označevalnega gena oz. iskanega gena določimo z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov (Herzog Velikonja in Gruden, 2000; Nelson in Cox, 2004). Da se izognemo pomnoževanju genomske DNK, testni eluat obdelamo še z DNazo, ki razgradi DNK. Za forenzično najpomembnejše telesne tekočine je bilo odkritih že nekaj biomarkerjev mRNK.

2.3.1 Stabilnost mRNK

Znano je, da so encimi, ki razgrajujejo RNK (ribonukleaze) prisotni povsod. Prav zato so domnevali, da bo izolacija RNK iz forenzičnih vzorcev predstavljala težavo. Forenzični vzorci so namreč zavarovani kasneje in tako so dalj časa izpostavljeni različnim zunanjim dejavnikom. Kljub temu so nekateri avtorji poročali o uspešni izolaciji RNK iz bioloških vzorcev, ki so bili izpostavljeni zunanjim dejavnikom (Juusola in Ballantyne, 2003; Setzer in sod., 2008). mRNK so lahko zaznali v vzorcih krvi in slin, ki so bili shranjeni pri sobni temperaturi 365 dni. Prav tako so mRNK iz vaginalnih izločkov in sperme našli v vzorcih, ki so bili shranjeni pri sobni temperaturi vsaj 547 dni (Setzer in sod., 2008). Glede na njihove članke je bila stabilnost mRNK v zunanjih okoljih občutno manjša, vendar pa jim je uspelo za nadaljnjo analizo izolirati zadostne količine mRNK iz vzorcev, ki so bili več dni izpostavljeni zunanjim dejavnikom.

2.3.2 Vaginalni izločki

2.3.2.1 Mucini

Mucini imajo veliko molekulsko maso in so večinoma glikozilirani proteini. Izražajo se tako v epitelijskih (viskozni izločki epitelnih celic) kot tudi v endotelijskih celicah (Hollingsworth in Swanson, 2004). Sestavljeni so iz dolgih polipeptidnih verig in krajših ogljikovih hidratov. Glavna funkcija vseh mucinov je zaščita in mazanje (mukoza) (Moniaux in sod., 2001; Hollingsworth in Swanson, 2004). Prav tako so mucini vključeni pri diferenciaciji in obnavljanju celic ter sodelujejo pri celičnem signaliziranju in imunskem odzivu (Wesseling in sod., 1995; Satoh in sod., 2000). Na splošno mucine delimo v tri skupine: gelformirajoči/sekrecijski mucini, topni mucini in membranski mucini. Vsaka skupina mucinov ima karakteristično zgradbo in svoje delovanje v specifičnem tkivu. Sekrecijski mucini se izražajo izključno v specializiranih epitelnih celicah (sekrecijski epitelij) in imajo omejeno izražanje. Za razliko od sekrecijskih mucinov, imajo membransko vezani mucini visoko stopnjo izražanja po celotnem človeškem telesu (Chaturvedi in sod., 2008). Znanih je vsaj 19 mucinov. mRNK mucina 4 je ena izmed prevladujočih mRNK urogenitalnega trakta, najdemo pa jo tudi v celicah jajcevoda, maternice, ustne votline in vagine. Mukozni gel (MUC4 komponenta mukoze) ima pomembno vlogo pri reprodukciji in zaščiti ženskega reproduktivnega trakta (Hafez, 1980). Ščiti površino reproduktivnega trakta pred patogenimi vstopi in pomaga pri vходу spermijev v maternico (Hafez, 1980; Gipson in sod., 1997, 1999). Posebnost MUC4 je tudi ta, da je bil potrjen v epiteliju materničnega vratu in je tako postal primeren označevalec za vaginalne izločke (Juusola in Ballantyne, 2005; Nussbaumer in sod., 2006; Setzer in sod., 2008; Cossu in sod., 2009; Haas in sod., 2009).

Nussbaumer in sodelavci (2006) so poročali, da izražanje MUC4 v vaginalnih izločkih korelira z MUC4 v slini in da samo uporaba označevalca MUC4 za ugotavljanje vaginalnih izločkov ni primerna. Zubakov in sod. (2008) menijo, da je najdba označevalca, ki bi se izražal samo v vaginalnih izločkih, zelo težka ali pa celo neverjetna. Ugotovili so, da je izražanje označevalnih genov za vaginalne izločke zelo podobno izražanju genov v slini in krvi. Svoje izsledke so podkrepili še z ugotovitvami Liuja in sod. (2002) ter Parka in sod. (2006). Zadnji so dokazali visoko biokemično in histološko podobnost med celicami ustne sluznice in vaginalnimi celicami. Cossu in sod. (2009) so predlagali uporabo dodatnih označevalcev za ugotovitev prisotnosti vaginalnih izločkov. Prav zaradi lažno pozitivnih rezultatov se poleg MUC4 uporabljajo še drugi označevalci.

2.3.2.2 Vaginalna flora

Vaginalna flora ima veliko dominantnih bakterij, laktobacilov, ki ščitijo gostitelja pred urogenitalnimi okužbami. Ugotovili so, da se *Lactobacillus jensenii* zelo težko množi izven telesa. Pravzaprav je pri zdravih ženskah *Lactobacillus jensenii*, skupaj z *Lactobacillus gasseri* in *Lactobacillus crispatus*, naravno prisoten vaginalni sev v sluznici nožnice. Omenjena bakterija, *L. jensenii*, predstavlja do 23 % celotne vaginalne populacije (sledi ji *Lactobacillus crispatus* – do 32 %), kar jo uvršča kot drugo najbolj pogosto bakterijo v spodnjem delu nožnice (Brogden in Guthmiller, 2002). *Lactobacillus jensenii* je anaerobna po Gramu pozitivna nesporogena bakterija (Falsen in sod., 1999). Idealni

pogoji, potrebni za rast, so temperatura 45 °C, folna kislina, vitamin B 12, vitamin B 3 (nikotinska kislina) in vitamin B 5 (pantotenska kislina). Od ostalih vrst jo lahko razlikujemo po več značilnostih, in sicer hidrolizira arginin, končni produkt fermentacije je D-(–)-laktična kislina in ima sposobnost fermentacije galaktoze, salicina, aesculina, amigdalina, saharoze, riboze in celobioze. Ne more pa fermentirati laktoze, melezitosa, manitola, sorbitola, arabinola in ksiloze (Gasser in sod., 1970). Kislost vaginalne flore je pogojena s prisotnostjo laktobacilov. Predvsem v času menstruacije, ko je prisotna velika koncentracija estrogena, se glikogen izloča v vaginalnih epitelnih celicah. Ker *L. jensenii* anaerobno presnavlja glikogen v očetno in mlečno kislino, je vaginalna flora kislila, pH 4. Kislo okolje deluje baktericidno in tako preprečuje okužbe (infekcije) (Boskey in sod., 1999). St Amant in sod. (2002) so poročali, da *Lactobacillus jensenii* in *Lactobacillus crispatus* zmanjšata možnost okužbe z gonorejo.

V mnogih študijah je bilo ugotovljeno, da je *Lactobacillus crispatus* ključen za ohranitev plodnosti in preprečevanju vaginalnih infekcij kot sta npr. bakterijska vaginoza in vulvo-vaginalna atrofija (Mitchell in sod., 2012; Brotman in sod., 2014). Omenjene okužbe lahko povzročajo suhost sluznice, draženje, pekoč občutek, srbenje in bolečine. *Lactobacillus crispatus* preprečuje te okužbe tako, da vzdržuje ravnovesje mikrobne populacije in nizek pH. Namreč s produkcijo mlečne kisline iz sladkorjev, kjer uporablja homofermentativni metabolizem, upočasnjuje razgradnjo epitelijskih celic materničnega vratu. Če se zmanjša populacija *Lactobacillus crispatus*, bo najverjetneje prišlo do nastanka bakterijske vaginoze (Motevaseli in sod., 2013).

Lactobacillus gasseri je anaerobna po Gramu pozitivna nesporogena bakterija, ki se večinoma nahaja v okoljih, kjer ni prisotnega kisika. Tako poleg tega, da preprečuje vaginalne infekcije, tudi pomaga pri lajšanju menstrualnih bolečin (Tailliez, 2004; Itoh in sod., 2011).

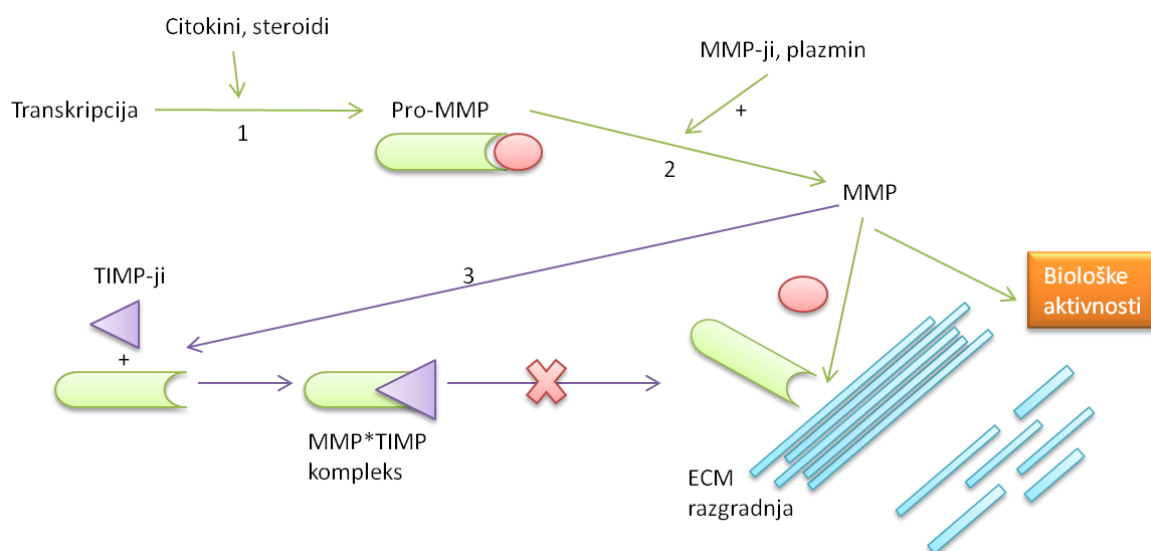
Hansona in Ballanty (2013) sta poročala še o dveh označevalcih, in sicer MYOZ1 (Myozenin-1) in CYP2B7P1 (cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 7 pseudogene 1). Pokazala sta dosledno specifičnost in občutljivost za ugotavljanje vaginalnih izločkov, predvsem pri razlikovanju med slino in celicami kože ter vaginalnimi izločki. Pri CYP2B7P1 ni bila ugotovljena nikakršna navzkrižna reakcija z ostalimi forenzično pomembnimi telesnimi izločki/tkivi. Poleg vseh do zdaj omenjenih označevalcev se za ugotavljanje vaginalnih izločkov uporablja tudi Humani β -defenzin 1 (HBD1). Ta je antimikrobni protein urogenitalnega tkiva. Omenjeni protein lahko s pomočjo RT-PCR najdemo v mnogih organih in tkivih, vendar v manjših koncentracijah, kot v urogenitalnem tkivu (Valore in sod., 1998). Juusola in Ballantyne (2005) ter Haas in sod. (2009) so poročali o uspešni uporabi MYOZ1 in CYP2B7P1 pri identifikaciji vaginalnih izločkov.

2.3.3 Menstrualna kri

2.3.3.1 Matriksne metaloproteinaze

Pravočasna razgradnja medceličnega prostora (ekstracelularni matriks – ECM) je bistvenega pomena za razvoj zarodka, morfogenezo, razmnoževanje, tkivno resorbcijo in preoblikovanje. Matriksne metaloproteinaze (MMP) so od cinka odvisne endopeptidaze in

imajo osrednjo vlogo pri teh procesih (Woessner in Nagase, 2000). Med MMP spadajo kolagenaze, gelatinaze (želatinaze), stromelizin, stromelizinu podobne MMP in membranski tip MMP. Endometrium je sestavljen iz kolagena, laminina, želatine, fibronektina, proteoglikanov in hialuronske kisline. MMP uravnavajo razgradnjo vseh komponent ECM. MMP so večinoma izločajo v neaktivni obliki (Pro-MMP) in se aktivirajo ob nizki koncentraciji progesterona in ob ostalih lokalnih signalih (Zhang in Nothnick, 2005). Namreč menstrualni cikel se pojavi kot posledica nihanja gonadotropnih hormonov FSH (folikule-stimulativni hormon) in LH (luteinizirajoči hormon). Povprečno menstrualni cikel traja 28 dni in ga delimo na preovulatorno in postovulatorno fazo. Preovulatorna faza se začne z menstrualno krvavitvijo, ki jo spremljajo nizke serumske koncentracije ženskih spolnih hormonov estrogena in progesterona (Hawkins in Matzuk, 2004; Tomšič in sod., 2014). Zaradi nizke koncentracije progesterona pri menstruaciji prihaja do produkcije in aktivacije MMP in sproščanja specifičnih tkivnih inhibitorjev (TIMP) ter posledično do razgradnje matriksa, slika 3 (Nair in Taylor, 2010). Poznamo 4 različne tipe, to je TIMP-1,-2,-3,-4. Sodelujejo pri razgradnji in preoblikovanju tkiv in se vežejo tako na aktivno obliko kot na proMMP in lahko inhibirajo avtokatalitsko aktivacijo (Rogers in Abberton, 2003). Pri preovulatorni fazi pride do postopnega porasta koncentracije estrogena, ki svoj vrh doseže 14. dan po začetku cikla, kar časovno sovпада z ovulacijo. V drugem delu cikla poraste serumska koncentracija progesterona, koncentracija estrogena pa še vedno ostaja na povišani ravni. Ob koncu menstrualnega cikla pride do upada serumske koncentracije estrogena in progesterona, nov cikel pa se ponovno začne z menstrualno krvavitvijo (Hawkins in Matzuk, 2004; Tomšič in sod., 2014).



Slika 3: Metaloproteinazni sistem. Delovanje MMP se uravnava na ravni transkripcije (1), aktivacije (2) in na tkivni ravni (3) s specifičnimi tkivnimi inhibitorji (TIMP). Ko je MMP aktiviran in ni inhibiran lahko razgradi ekstracelularni matriks – ECM ali pa preko celičnega signaliziranja uravnava številne biološke aktivnosti (Zhang in Nothnick, 2005).

Tudi protein staterin (STATH) je v človeški slini in je večopravilna molekula. Ima visoko afiniteto vezave mineralov kalcijevega fosfata, npr. hidroksiapatita. Prav tako vzdržuje ustrezno mineralno dinamiko sklenine, pospešuje selektivno kolonizacijo bakterij in služi kot mazivo na površini sklenine (Hay, 1973; Hay in Schlesinger, 1977; Hayin sod., 1984; Raj in sod., 1992).

2.3.4 Semenska tekočina

Za ugotavljanje semenske tekočine se trenutno uporabljajo naslednji biomarkerji oz. označevalci: protamin 1 in 2 (PRM1, PRM2), transglutaminaza 4 (TGM4), PSA protein in semenogelin (SEMG1) (Steger in sod., 2000; Bauer in Patzelt, 2003; Alvarez in sod., 2004; Juusola in Ballantyne, 2005; Setzer in sod., 2008; Haas in sod., 2009; Roeder in Haas, 2012). Protamini so majhni, z argininom bogati jedrni proteini, ki zamenjajo histone v pozni haploidni fazi spermatogeneze in tako omogočijo gostejše pakiranje in stabilnost DNK v spermiju (Heller in Clermont, 1963; Kornberg in Lorch, 1999; Balhorn, 2007). Transglutaminaza 4 je encim, ki ga izloča prostata, in njegova mRNK se je izkazala kot dober označevalec za ugotavljanje prisotnosti semenske tekočine (Fang in sod., 2006; Grant in sod., 1994).

2.3.5 Hišni gen

Najpogostejši način razgradnje glukoze je EMP pot. Embden, Mayerhof in Parnas so leta 1940 dokazali vse vmesne stopnje pri razgradnji glukoze v piruvat. V prvem delu pride do nastanka gliceraldehid-3-fosfata, v drugem in tretjem delu pa do nastanka ATP in dveh molekul piruvata. Slednja vstopata v proces oksidativne fosforilacije ali pa se razgradita z alkoholno ali mlečno fermentacijo v anaerobnih pogojih do etanola in ogljikovega dioksida ali do laktata. V 6. stopnji glikolize se molekula gliceraldehid-3-fosfat fosforilizira z dodatno molekulo anorganskega fosfata z encimom GAPDH (Madigan in sod., 2000). Ker se GAPDH stalno in podobno izraža v različnih tkivih, ne glede na starost in spol, ga lahko upoštevamo kot hišni gen (ang. housekeeping gene) (Barber in sod., 2005). Zaradi te lastnosti ga pogosto uporabljamo za preučevanje izražanja drugih genov, vendar moramo biti previdni pri razlagi rezultatov, saj so Piszczatowski in sod. (2014) poročali da izražanje GAPDH gena lahko uravnava tudi transkripcijski faktor MZF-1 (myeloid zinc finger-1) tudi uravnava GAPDH gen.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Specifičnost in zanesljivost biomarkerjev mRNK

Za ugotavljanje specifičnosti in zanesljivosti biomarkerjev mRNK za vaginalne izločke (MYOZ1, CYP2B7P1, MUC4, HBD1, LJEN, LCRIS, LGAS), menstrualno kri (MMP7 in MMP11) in slino (STATH in HTN3), smo s sterilnimi bombažnimi paličicami, proizvajalca Applimed SA, odvzeli vaginalne brise različnih žensk v času, ko niso imele menstruacije in v času njihove menstruacije, ter brise ustne sluznice, in sicer kot prikazuje preglednica 1. Gen GAPDH nam je služil kot pozitivna kontrola.

Preglednica 1: Opis vzorcev za ugotavljanje specifičnosti in zanesljivosti biomarkerjev mRNK.

Table 1: Samples for determining the specificity and reliability of RNA biomarkers.

Ženske št.	Starost ženske	Uporaba kontr.	1. dan menst.	2. dan menst.	3. dan menst.	4. dan menst.	5. dan menst.	Vaginalni bris	Bris ustne sluznice
1	25	+	+	+	+	+	+	+	+
2	28	+	+	+	+	+	Konec +	+	+
3	29	-	+	+	+	+	+	+	+
4	30	-	+	+	+	+	+	+	+
5	30	-	+	+	+	Konec +	+	+	+
6	51	-	/	/	/	/	/	+	+

V preglednici so z oznako (+) označeni vzorci, kjer smo odvzeli brise. Ženska št. 2 je imela konec menstruacije 5. dan, ženska št. 5 pa 4. dan. Brisi, ki jih nismo odvzeli so označeni z znakom (/).

3.1.2 Specifičnost in zanesljivost biomarkerjev mRNK v vzorcih, pridobljenih po spolnih odnosih

Penilne brise za ugotavljanje MUC4, STATH in HTN3 ter GAPDH smo zbrali 5-krat od različnih prostovoljcev, z njihovo polno privolitvijo. Penilni brisi so bili odvzeti iz obrezanih in neobrezanih penisov, s sterilnimi bombažnimi paličicami proizvajalca Applimed SA, 1 uro po spolnem odnosu brez ejakulacije, in sicer pri heteroseksualnih kot tudi pri homoseksualnih parih (vaginalni spolni odnos, oralni spolni odnos in analni spolni odnos). Za pozitivno kontrolo smo vzeli brise mandeljnov. Prav tako smo iz neobrezanih penisov odvzeli brise smegme.

3.1.3 Forenzični vzorci, pridobljeni pri preiskovanju resničnih kaznivih dejanj

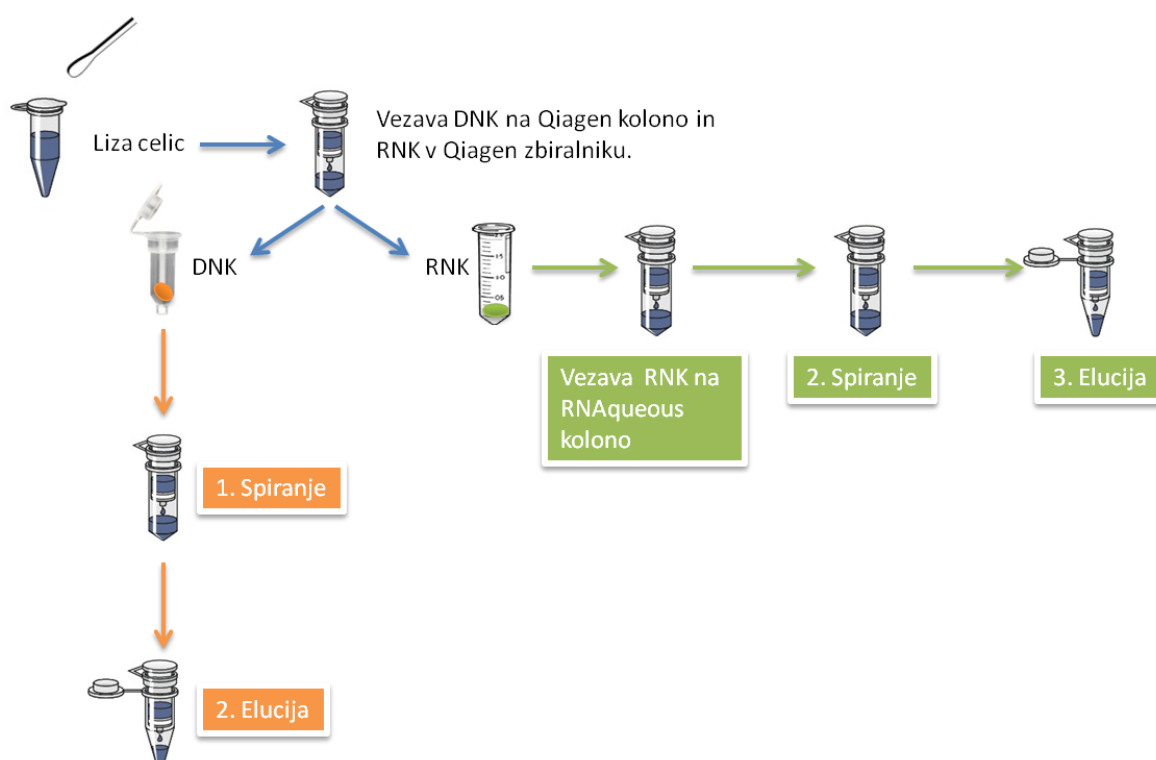
V vseh spodaj naštetih primerih je bil spolni odnos dokazan z najdbo semenske tekočine v vagini oškodovanke (Phosphatesma KM pozitivna, PSA Semiquant pozitiven, diferencialna liza - v moški frakciji samo moška komponenta) in/ali priznanjem storilcev ter pravnomočno sodbo:

- I. Spolna zloraba slabotne osebe, kjer sta moška izvedla posilstvo 16 letne ženske. Moška sta bila prijeta 3 ure po kaznivem dejanju. V preiskavo so bili med drugim (oblačila osumljenih in oškodvanke) poslani tudi naslednji vzorci:
 - penilni bris, odvzet moškemu X,
 - spodnje hlače moškega X in
 - spodnje hlače moškega Y.
- II. Spolni napad na osebo mlajšo od 15 let, kjer je očim spolno občeval s svojo pastorko. Moški je bil prijet 1 uro po dogodku. V preiskavo so bili med drugim (oblačila osumljenega in oškodvanke) poslani tudi naslednji vzorci:
 - črne spodnje hlače, ki jih je imel očim oblečene na dan kaznivega dejanja,
 - bele spodnje hlače, ki jih je imel očim oblečene dan pred zaznavo kaznivega dejanja (dodajamo, da sta imela tudi dan pred odkritjem kaznivega dejanja spolne odnose) in
 - penilni bris.
- III. Posilstvo in poskus posilstva, kjer je moški vstavljajal prste v vagino ženske A (roj. 1941) in vagino ženske B (roj. 1950). V preiskavo so bili med drugim (oblačila osumljenega in oškodvanke) poslani tudi naslednji vzorci:
 - brisi, odvzeti s prstov in dlani desne in leve roke.
- IV. Posilstvo, kjer je moški posilil žensko, roj. 1987. V preiskavo so bili med drugim (oblačila osumljenega in oškodvanke) poslani tudi naslednji vzorci:
 - spodnje hlače osumljenega in
 - penilni bris.
- V. Lažna prijava posilstva, kjer se je ženska samozadovoljevala in doživela orgazem na stolu. V preiskavo je bil poslan bris bioloških sledi, pobran s stola.
- VI. Posilstvo, kjer je osumljeni z oškodovanko večkrat in na posebno grozovit in poniževalen način seksal. V preiskavo so bili med drugim (oblačila osumljenega in oškodvanke) poslani tudi naslednji vzorci:
 - penilni bris osumljenega.

3.2 METODE

3.2.1 RNK/DNK izolacija

Ves delovni prostor in pipete smo očistili z dekontaminacijsko raztopino RNaseZap (Ambion/Applied Biosystems). Pincete, škarje, koške in mikrocentrifugirke, ki smo jih uporabljali pri izolaciji DNK in RNK, smo 2-krat sterilizirali 20 minut pri 121 °C. RNK in DNK smo iz vzorcev bioloških sledi (vatirana paličica ali vzorci bioloških sledi, ki smo jih odvzeli s posebnimi lepilnimi trakovi (WA Products) iz notranjosti spodnjih hlač v predelu penisa) izolirali s pomočjo kompleta RNAqueous® -Micro Kit (Ambion/Applied Biosystems) in QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen), po navodilih proizvajalca z določenimi spremembami (slika 5).



Slika 5: Postopek izolacije RNK in DNK.

Figure 5: Process for the isolation of RNA and DNA

1. V 1,5mL mikrocentrifugirko (Ambion® Non-Stick RNase-free) z vzorcem smo dodali 350 µL liznega pufra (RNAqueous® - Micro Kit), vorteksirali 20 s, nato inkubirali 20 min pri 56 °C s stresanjem (na vsake 4 min smo stresali 1 min pri 1400 rpm).
2. Po končani inkubaciji smo mikrocentrifugirko na kratko centrifugirali.
3. Dodali smo 220 µL 100% etanola in vorteksirali 20 s.
4. Mikrocentrifugirko smo na kratko centrifugirali.
5. S pomočjo pincete smo vatko ali izrezane lepilne trakove prenesli v sterilno košek za mikrocentrifugirko in centrifugirali 2 min pri 12 000 rpm.

6. Košek smo zavrgli in ves lizat prenesli v QIAamp kolono ter centrifugirali 1 min pri 8000 rpm. Tako smo v QIAamp koloni dobili vezano DNK in v QIAamp zbiralniku RNK.
7. QIAamp kolono smo prenesli v nov QIAamp zbiralnik in izolacijo DNK nadaljevali po navodilih proizvajalca, in sicer od vključno spiranja DNK z pufrom AW1 naprej (QIAamp DNA Investigator Kit). Končni volumen eluata je bil 33 μ L.
8. Iz QIAamp zbiralnika smo RNK prenesli v RNAqueous kolono (ne več kot 150 μ L) in centrifugirali 10 s pri maksimalni hitrosti. Ker smo imeli volumen lizata več kot 150 μ L, smo v RNAqueous kolono najprej prenesli 150 μ L lizata in postopek ponavljali dokler nismo prenesli celotnega lizata.
9. Izolacijo RNK smo nadaljevali po navodilih proizvajalca RNAqueous® -Micro Kit. Končni volumen eluata je bil 25 μ L (penilni brisi in forenzični vzorci) ali 30 μ L (»čisti« vzorci, pridobljeni od različni prostovoljcev).

3.2.2 Obratna transkripcija

Za obratno transkripcijo 20 μ L reakcije smo uporabili 0,2mL mikrocentrifugirke (Thin-Walled, Frosted Lid, RNase-free PCR Tubes, Ambion/Applied Biosystems), High-Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems®, Life Technologies) in SUPERase•In™ RNase Inhibitor (20 U/ μ L) (Ambion/Applied Biosystems), po navodilih proizvajalcev. Preglednica 2 prikazuje volumne reagentov reakcijske mešanice za 1 vzorec, ki smo jo pripravili na ledu.

Preglednica 2: Sestava reakcijske mešanice za obratno transkripcijo 1 vzorca.

Table 2: Composition of the reaction mixture for the reverse transcription for 1 sample.

Komponenta	Volumen [μ L]
10X RT pufer	2,0
25X dNTP (100 mM)	0,8
10X RT naključnih začetnih oligonukleotidov	2
MultiScribe™ reverzna transkriptaza	1
RNAza inhibitor	1
DEPC voda	3,2
Skupni volumen	10

Reakcijski mešanici 10 μ L smo dodali 10 μ L RNK. Prepisovanje RNK v cDNK smo izvedli po protokolu proizvajalca na termociklerju Veriti®, Applied Biosystems®, preglednica 3.

Preglednica 3: Program pomnoževanja, po katerem je potekala obratna transkripcija.

Table 3: Reverse transcription amplification.

Temperatura (°C)	1. korak	2. korak	3. korak	4. korak
	25	37	85	4
Čas	10 min	120 min	5 min	∞

3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR reakcija)

3.2.3.1 Enojna verižna reakcija s polimerazo

V končnem volumnu 25 μL smo pomnoževali 2 μL cDNK. Reakcijska mešanica za enojni PCR je vsebovala 10X PCR pufer II (pH 8,3, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl_2 , 1,25 enot AmpliTaq Gold® DNK polimeraze (5U/ μL), 0,125 mM vsakega dNTP-ja in različne koncentracije začetnih oligonukleotidov. Preglednica 4 prikazuje sestavo reakcijske mešanice za eno reakcijo PCR. Vsi reagenti, ki smo jih uporabili pri enojni PCR reakciji, in začetni oligonukleotidi so od podjetja Applied Biosystems®, Life Technologies. Kot negativno kontrolo, za ugotavljanje prisotnosti genomske DNK, smo uporabili 2 μL RNK. Preglednica 5 prikazuje uporabljene začetne oligonukleotide in pričakovani produkt. Enojno PCR pomnoževanje za MUC4, STATH, HTN3, MMP7, MMP11 in GAPDH je potekalo v termociklerju Veriti®, Applied Biosystems®, Life Technologies, pri sledečih pogojih: denaturacijski korak (95 °C, 11 min), kateremu je sledilo 35 ciklov (94 °C, 20 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 40 s) in faza podaljševanja pri 75 °C, 5 min.

Preglednica 4: Sestava reakcijske mešanice za eno reakcijo PCR.

Table 4: Primer and PCR amplification for one reaction.

Komponenta	Volumen [μL]
10X PCR pufer II	2,5
MgCl_2	1,5
dNTP	1,25
AmpliTaQ Gold® DNK polimeraza	0,25
cDNK	2
GAPDH [0,40 μM]	1 f + 1 r + 15,5 DEPC vode
MMP11 [0,40 μM]	1 f + 1 r + 15,5 DEPC vode
MUC4 [0,04 μM]	1 f + 1 r + 15,5 DEPC vode
MMP7 [0,16 μM]	4 f + 4 r + 9,5 DEPC vode
STATH [0,16 μM]	4 f + 4 r + 9,5 DEPC vode
HTN3 [0,16 μM]	4 f + 4 r + 9,5 DEPC vode

Enojna PCR reakcija za pomnoževanje gena HBD1 je v 25 μL reakcijski mešanici vsebovala 5 μL cDNK, 2,5 μL dNTP-jev (2,5 mM vsakega), 2,5 μL 10X PCR pufer II, 3 μL MgCl_2 (25 mM), 2 μL 12,5X začetnih oligonukleotidov, 0,4 μL AmpliTaq Gold® DNK polimeraze (5U/ μL) in 9,6 μL DEPC vode. Koncentracija 12,5X začetnih oligonukleotidov HBD1 je bila 20 μM . Enojno PCR pomnoževanje za HBD1 je potekalo v termociklerju Veriti®, Applied Biosystems®, Life Technologies, pri sledečih pogojih:

denaturacijski korak (95 °C, 11 min), kateremu je sledilo 35 ciklov (94 °C, 20 s; 55 °C, 60 s; 72 °C, 45 s) in faza podaljševanja pri 75 °C, 30 min.

Preglednica 5: Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov in velikosti pričakovanih produktov.

Table 5: Used primers and expected products.

Telesna tekočina	Gen	Začetni oligonukleotidi vodilni začetni oligonukleotid (forward) povratni začetni oligonukleotid (reverse)	Barvilo	Velikost [bp]	Vir
Vaginalni izločki	MUC4 *	f: GGA CCA CAT TTT ATC AGG AA r: TAG AGA AAC AGG GCA TAG GA	FAM /NED	235	Juusola in Ballantyne, 2005
	HBD1	f: CCT GGG TGT TGC CTG CCA GTC GC r: CAG GTG CCT TGA ATT TTG GT	FAM	200	Roeder in Haas, 2012
	MYOZ1	f: GGG TTG GTG AGA CAG GAT CA r: TCC CAT GGG GAA ATA TAG GT	FAM	81	Hanson in Ballantyne, 2013
	CYP2B7P1	f: TCC TTT CTG AGG TTC CGA GA r: TTT CCA TTG GCA AAG AGC AT	FAM	198	Hanson in Ballantyne, 2013
	Ljen [16S-23S ISR]	f: AAG TCG AGC GAG CTT GCC TAT TGA AAT r: CGC CTT TTA AAC TTC TTT CAT GCG AAA GTA GC	FAM	171	Roeder in Haas, 2012
	Lcris [16S-23S ISR]	f: GAG AGC AGG AAT GCT AAG AG r: CCG GAT CAT TGC TTA CTT AC	FAM	292	Haas in sod., 2014
	Lgas [16S-23S ISR]	f: ATG ATG GAG AGT GCG AGA GC r: CCG GAT CAT TGC TTA CTT AC	FAM	311	Haas in sod., 2014
Slina	STATH	f: TTT GCC TTC ATC TTG GCT CT r: CCC ATA ACC GAA TCT TCC AA	FAM	93	Haas in sod., 2009
	HTN3	f: GCA AAG AGA CAT CAT GGG TA r: GCC AGT CAA ACC TCC ATA ATC	FAM	134	Alvarez in sod., 2004
Menstrualna kri	MMP7 **	f: TCA ACC ATA GGT CCA AGA AC r: CAA AGA ATT TTT GCA TCT CC	HEX	240	Haas in sod., 2009
	MMP7	f: CAT GAG TGA GCT ACA GTG GGA ACA GGC r: CTA TGA CGC GGG AGT TTA ACA TTC CAG	FAM	161	Roeder in Haas, 2012
	MMP11***	f: GGT GCC CTC TGA GAT CGA C r: TCA CAG GGT CAA ACT TCC AGT	FAM	92	Haas in sod., 2009
Vzdrževalni gen	GAPDH	f: TCT TCA CCA CCA CGG AGA A r: AGG GGG CAG AGA TGA TGA C	HEX	72	Haas in sod., 2009

* Koncentracija začetnega oligonukleotida za MUC4 je bila pri enojni PCR reakciji 0,04 µM, pri sočasni PCR pa 2 µM.

** Koncentracija začetnega oligonukleotida za MMP7 je bila pri enojni PCR reakciji 0,16 µM, pri sočasni PCR pa 2 µM. Dodajmo, da smo pri sočasni PCR uporabili drugačen niz začetnih oligonukleotidov.

*** Koncentracija začetnega oligonukleotida za MMP11 je bila pri enojni PCR reakciji 0,40 µM, pri sočasni PCR pa 2 µM.

3.2.3.1 Sočasna PCR reakcija

Sočasna PCR reakcija je v 25 μ L reakcijski mešanici vsebovala 2 μ L cDNK, 2,5 μ L 10X začetnih oligonukleotidov (Preglednica 5), 12,5 μ L 2X Multiplex PCR Mastermix (Multiplex PCR kit, QIAGEN), 2,5 μ L Q-Solution (Multiplex PCR kit; QIAGEN) in 5,5 μ L H₂O. 10X začetni oligonukleotidi so vsebovali naslednje koncentracije: MMP tripleks 2 μ M vsakega označevalca (MMP7, MMP 10 in MMP11); Vag tripleks 2 μ M vsakega označevalca (MUC4, MYOZ1, CYP2B7P1); Lacto tripleks 2 μ M vsakega označevalca (Ljen, Lcris, Lgas).

Sočasno PCR pomnoževanje za MMP tripleks, Vag tripleks in Lacto tripleks je potekalo v termociklerju Veriti®, Applied Biosystems®, Life Technologies, pri sledečih pogojih: denuracijski korak (95 °C, 15 min), kateremu je sledilo 35 ciklov (94 °C, 20 s; 55 °C, 90 s; 72 °C, 40 s) in faza podaljševanja pri 75 °C, 30 min.

3.2.4 PCR v realnem času

DNK, izolirani iz forenzičnih vzorcev, smo z metodo PCR v realnem času določili koncentracijo, po navodilih proizvajalca, in sicer s pomočjo naprave 7500 Real Time PCR Systems in kompleta bioreagentov Quantifiler Human DNA Quantification kit (oboje proizvajalca Applied Biosystems®, Life Technologies).

3.2.5 Kapilarna elektroforeza

Dolžino PCR produktov (Preglednica 5) smo določili s pomočjo genetskega analizatorja 3130 in 3500 (Applied Biosystems®, Life Technologies). K ustrezni količini Hi-Di formamida in internega standarda (GeneScan-500 ROX / GeneScan-600 LIZ, Applied Biosystems®, Life Technologies) smo dodali 1 μ L pomnoženega PCR produkta. Mikrotitrsko ploščo smo segreli na 95 °C za 3 min in jo nato takoj postavili v hladilni blok za mikrotitrsko ploščo za 3 min. Po tem smo izvedli kapilarno elektroforezo s pomočjo genetskega analizatorja 3130 in 3500. Podatke smo obdelali s programom GeneMapper® (Applied Biosystems®, Life Technologies), pri čemer je bila meja za pozitiven rezultat 50 RFU (Relativnih Fluorescentnih Enot) pri genetskem analizatorju 3130 in 100 RFU pri genetskem analizatorju 3500.

DNK smo sočasno izolirali skupaj z RNK in jo pomnoževali s kompletom AmpF ℓ STR® NGM™ kit, po navodilih proizvajalca (Applied Biosystems®, Life Technologies). Zaznavo profila DNK smo izvedli povsem enako kot pri zaznavi PCR produktov, dobljenih iz cDNK.

4 REZULTATI

4.1 TKIVNA SPECIFIČNOST IN ZANESLJIVOST mRNK

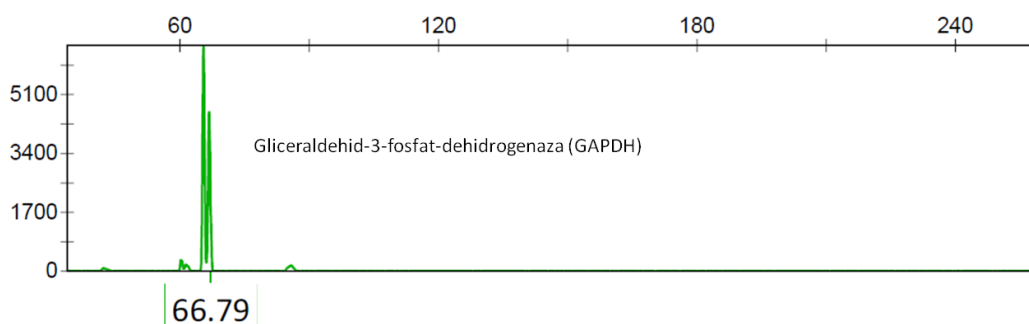
Za pozitivno identifikacijo vaginalnih izločkov, sline in menstrualne krvi smo uporabili naslednje označevalce: MYOZ1, CYP2B7P1, MUC4, HBD1, LJEN, LCRIS, in LGAS za vaginalne izločke (Juusola in Ballantyne, 2005; Roeder in Haas, 2012; Hanson in Ballantyne, 2013; Haas in sod., 2014), MMP7 in MMP11 za menstrualno kri (Haas in sod., 2009; Roeder in Haas, 2012) ter STATH in HTN3 za slino (Alvarez in sod., 2004; Haas in sod., 2009). Z enojno verižno reakcijo s polimerazo smo specifičnost označevalcev MUC4, MMP7, MMP11, HBD1, STATH in HTN3 ugotavljali s prisotnostjo specifičnega označevalca v izbrani telesni tekočini in odsotnostjo označevalca v drugi telesni tekočini (preglednica 6). Kot pozitivno kontrolo smo pri vseh vzorcih uporabili mRNK vzdrževalnega gena GAPDH.

Preglednica 6: Specifičnost mRNK označevalcev GAPDH, MUC4, MMP7, MMP11, HBD1, STATH in HTN3 pri »čistih« vzorcih, pridobljeni od različni prostovoljcev.

Table 6: Results showing specificity for GAPDH, MUC4, MMP7, MMP11, HBD1, STATH and HTN3 biomarkers in »pure« samples.

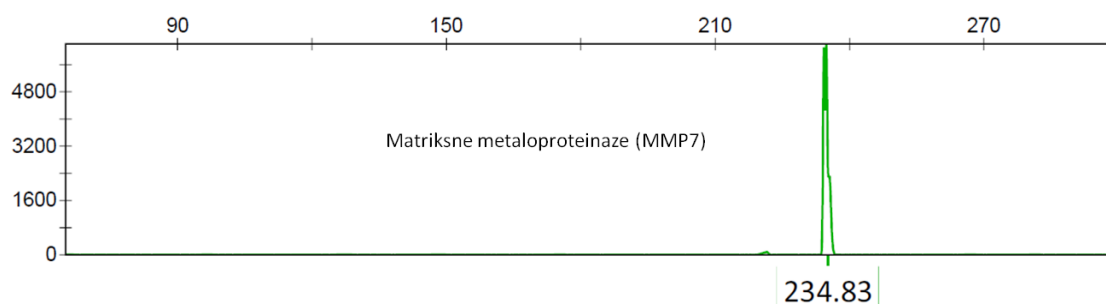
vzorec	Označevalec						
	GAPDH	MUC4	MMP7	MMP11	STATH	HTN3	HBD1
Vaginalni izločki	(42/42)	(32/42)	(6/42)	(8/42)	(0/42)	(0/42)	(42/42)
Slina	(42/42)	(3/42)	(0/42)	(0/42)	(42/42)	(42/42)	(8/42)

Številke v oklepajih predstavljajo PCR rezultat/število testiranih vzorcev. Gene GAPDH, MUC4, HBD1, STATH in HTN3 smo upoštevali kot izražene, če smo v katerem koli izmed analiziranih vzorcev našli PCR produkt gena.



Slika 6: Elektroferogram za gen GAPDH. Približna velikost ampikona 67 bp (Enojna PCR).

Figure 6: Detection of GAPDH gene. Approx. amplicon size 67 bp (single PCR reaction).



Slika 7: Elektroferogram za gen MMP7. Približna velikost amplikona 235 bp (Enojna PCR).

Figure 7: Detection of MMP7 gene. Approx. amplicon size 235 bp (single PCR reaction).

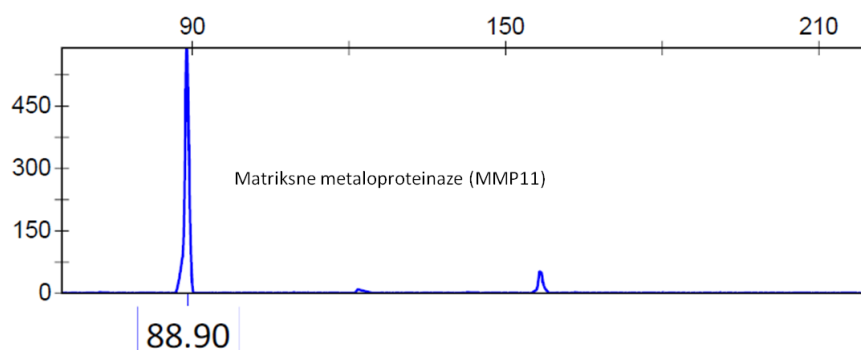
Označevalcev STATH in HTN3 nismo zasledili v nobenem vzorcu bioloških sledi odvzetih iz vagine, našli smo jih le v vzorcih sline. Transkripte MUC4 smo našli v 32 vaginalnih vzorcih in 3 vzorcih sline. Označevalca MMP7 in MMP11, za ugotavljanje menstrualne krvi, smo tudi našli v vaginalnih vzorcih. Produkt gena HBD1 smo našli v vseh vaginalnih vzorcih in 9 vzorcih sline. mRNK GAPDH smo ugotovili v vseh vzorcih. Negativna kontrola, za ugotovitev DNK kontaminacije, je bila negativna.

Izražanje genov MMP11 in MMP7 smo ugotavljali med celotnim menstrualnim ciklom in dobili sledeče rezultate, preglednica 7.

Preglednica 7: Izražanje genov MMP7 in MMP11 med potekom celotnega menstrualnega cikla.

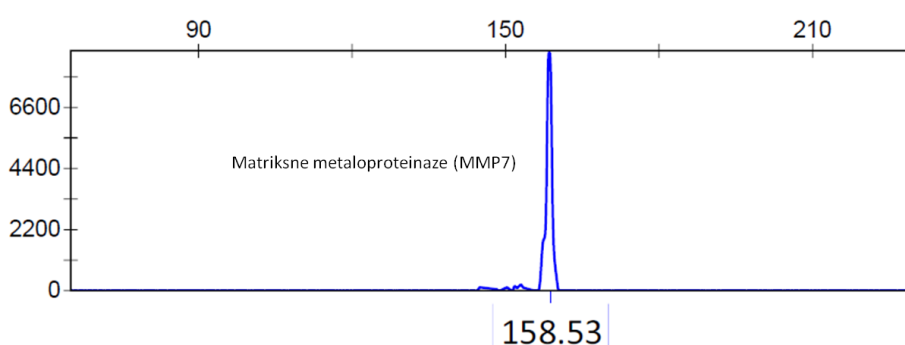
Table 7: Expression of MMP7 and MMP 11 genes during menstrual cycle.

	Starost ženske	Uporaba kontracepcije	1. dan menstruacije		2. dan menstruacije		3. dan menstruacije		4. dan menstruacije		5. dan menstruacije	
			MMP7	MMP11	MMP7	MMP11	MMP7	MMP11	MMP7	MMP11	MMP7	MMP11
Ženska št. 1	25	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Ženska št. 2	28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Ženska št. 3	29	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Ženska št. 4	30	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Ženska št. 5	30	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-



Slika 8: Elektroferogram za gen MMP11. Približna velikost amplicona 89 bp (Sočasna PCR).

Figure 8: Detection of MMP11 gene. Approx. amplicon size 89 bp (multiplex PCR reaction).



Slika 9: Elektroferogram za gen MMP7. Približna velikost amplicona 159 bp (Sočasna PCR).

Figure 9: Detection of MMP7 gene. Approx. amplicon size 159 bp (multiplex PCR reaction).

Prvi dan menstruacije smo v vseh vzorcih pomnožili MMP11 (5/5) ter v 4 vzorcih MMP7 (4/5). Drugi dan menstruacije smo pomnožili v vseh vzorcih oba označevalca. Tretji dan smo samo pri dveh ženskah dokazali MMP7, MMP11 pa pri vseh. Četrti dan menstruacije gena MMP7 nismo dokazali pri dveh ženskah, MMP11 pa pri eni ženski. Zadnji dan menstruacije pri treh ženskah nismo našli MMP7 transkriptov ter pri dveh ženskah MMP11 transkriptov. V preglednici 7 niso prikazani rezultati za gen GAPDH, vendar smo ga v vseh dneh menstruacije dokazali.

4.2 SPECIFIČNOST IN ZANESLJIVOST mRNK MUC4, STATH in HTN3 V PENILNIH BRISIH

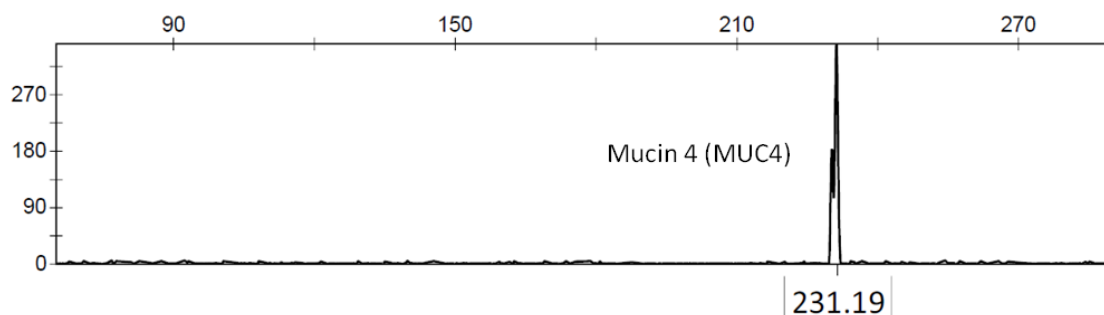
Mucin 4 (MUC4) smo našli v enem od petih vzorcih, odvzetih z obrezanega penisa, medtem ko smo našli MUC4 v vseh vzorcih, odvzetih z neobrezanega penisa. Vsi označevalci so bili negativni za vzorce, dobljene po analnem spolnem odnosu. STATH in HTN3 označevalci so bili pozitivni za vse vzorce, odvzete s penisa po oralnem spolnem odnosu in vzorce, odvzete iz mandeljnov. V vseh ostalih vzorcih STATH in HTN3 označevalca nismo našli. Nobene navzkrižne reakcije nismo zasledili in kontrolni označevalec GAPDH je bil pozitiven pri vseh vzorcih, razen pri vzorcih, odvzetih po analnih spolnih odnosih. MUC4, STATH in HTN3 transkriptov nismo zasledili v smegmi. Kratek povzetek rezultatov predstavljamo v preglednici 8. Slike 10, 11 in 12 prikazujejo elektroferograme za transkripte MUC4, STATH in HTN3.

Preglednica 8: Seznam penilnih brisov (mešanica bioloških sledi), odvzetih po različnih spolnih odnosih.

Table 8: Penile swabs taken after different sexual intercourses.

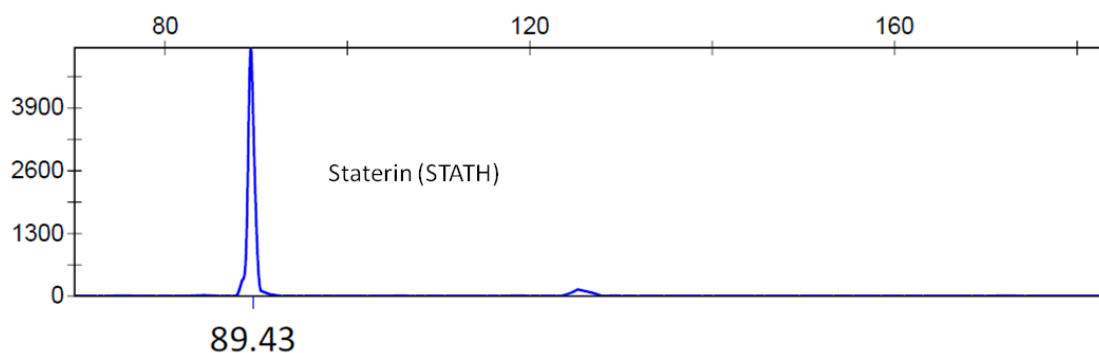
Vzorec	OZNAČEVALEC			
	GAPDH	MUC4	STATH	HTN3
Penilni bris – obrezan penis ¹	(5/5)	(1/5)	(0/5)	(0/5)
Penilni bris – neobrezan penis ¹	(5/5)	(5/5)	(0/5)	(0/5)
Penilni bris – neobrezan penis ²	(0/5)	(0/5)	(0/5)	(0/5)
Penilni bris – obrezan penis ³	(5/5)	(0/5)	(5/5)	(5/5)
Penilni bris – neobrezan penis ³	(5/5)	(0/5)	(5/5)	(5/5)
Penilni bris – obrezan penis ⁴	(5/5)	(0/5)	(5/5)	(5/5)
Penilni bris – neobrezan penis ⁴	(5/5)	(0/5)	(5/5)	(5/5)
smegma na penisu	(5/5)	(0/5)	(0/5)	(0/5)
Moški mandeljni	(5/5)	(0/5)	(5/5)	(5/5)
Ženski mandeljni	(5/5)	(0/5)	(5/5)	(5/5)
Negativna kontrola (DNA)	(0/5)	(0/5)	(0/5)	(0/5)

- 1) Vaginalni spolni odnos med dvema heteroseksualnima paroma.
- 2) Analni spolni odnos med dvema homoseksualnima paroma.
- 3) Oralni spolni odnos med dvema heteroseksualnima paroma.
- 4) Oralni spolni odnos med dvema homoseksualnima paroma.



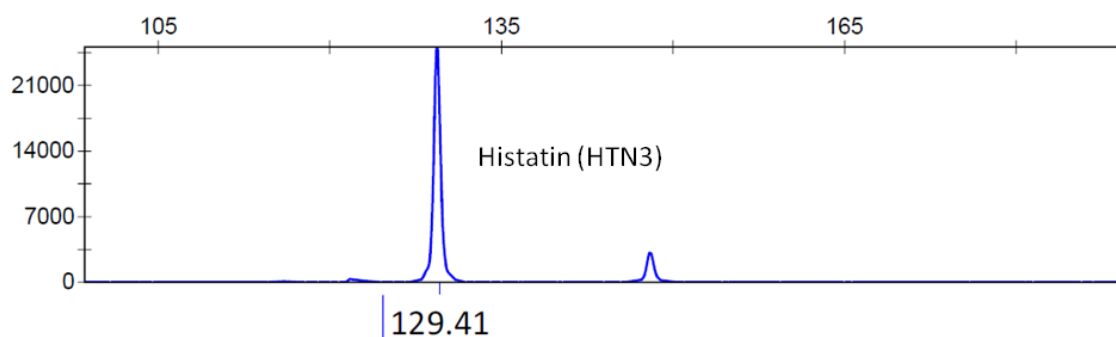
Slika 10: Elektroferogram za gen MUC4. Približna velikost amplikon 230 bp (Enojna PCR).

Figure 10: Detection of MUC4 gene. Approx. amplicon size 230 bp (multiplex PCR reaction).



Slika 11: Elektroferogram za gen STATH. Približna velikost amplicona 90 bp (Enojna PCR).

Figure 11: Detection of STATH gene. Approx. amplicon size 90 bp (single PCR reaction).



Slika 12: Elektroferogram za gen HTN3. Približna velikost amplicona 130 bp (Enojna PCR).

Figure 12: Detection of MMP7 gene. Approx. amplicon size 130 bp (single PCR reaction).

4.3 REZULTATI PREISKAV FORENZIČNIH VZORCEV

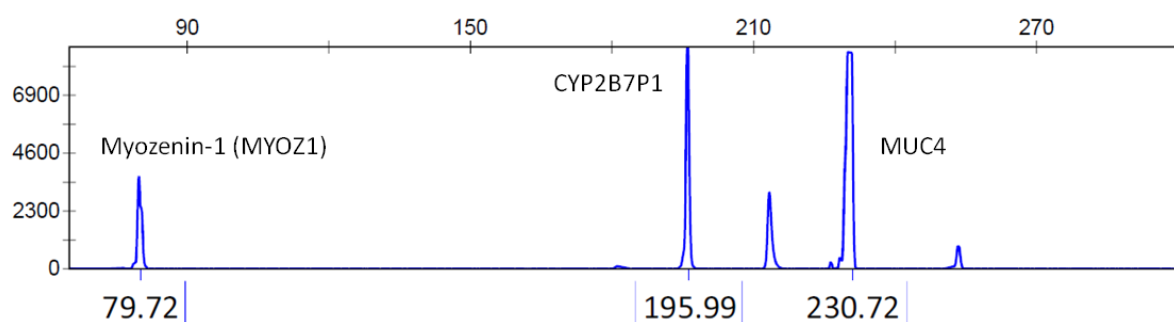
V preglednici 9 predstavljamo rezultate MYOZ1, CYP2B7P1, MUC4, HBD1, LJEN, LCRIS, in LGAS transkriptov za ugotavljanje prisotnosti vaginalnih izločkov ter STATH in HTN3 transkriptov za ugotavljanje prisotnosti sline na realnih forenzičnih vzorcih.

Preglednica 9: Dokazovanje mRNK označevalcev na realnih forenzičnih vzorcih.

Table 9: Results for mRNA markers on real forensic case work.

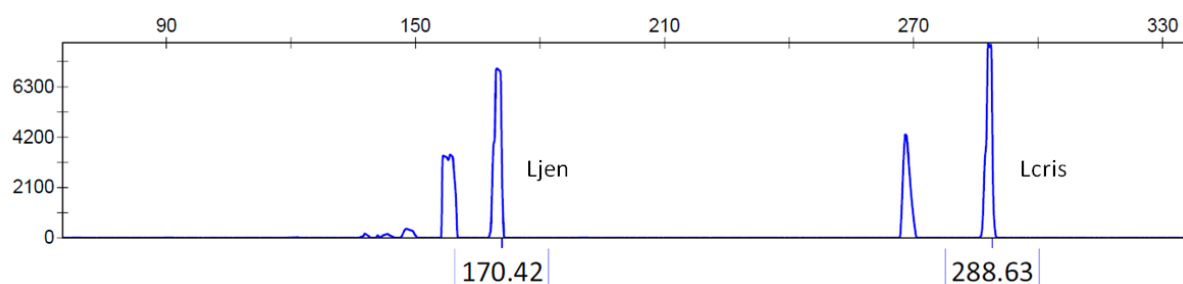
Vzorec	MYOZ1	CYP2B7P1	MUC4	LJEN	LCRIS	LGAS	HBD1	STATH	HTN3	GAPDH
Spodnje hlače, moški X, primer I	POZ	POZ	POZ	POZ	NEG	POZ	POZ	NEG	NEG	POZ
Sledi na penisu moškega X, primer I	POZ	NEG	NEG	POZ	NEG	POZ	NEG	NEG	NEG	POZ
Spodnje hlače, moški Y, primer I	NEG	NEG	POZ	POZ	NEG	NEG	POZ	NEG	NEG	POZ
Črne spodnje hlače, primer II	POZ	POZ	POZ	POZ	POZ	POZ	POZ	NEG	NEG	POZ
Bele spodnje hlače, primer II	POZ	POZ	POZ	POZ	NEG	POZ	POZ	NEG	NEG	POZ
Sledi na penisu, primer II	POZ	POZ	POZ	NEG	POZ	POZ	POZ	NEG	NEG	POZ
Sledi na prstih in dlaneh, primer III	NEG	NEG	NEG	POZ	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POZ
Spodnje hlače moškega, primer IV	POZ	POZ	POZ	POZ	POZ	POZ	POZ	NEG	NEG	POZ
Sledi na penisu, primer IV	NEG	NEG	NEG	NEG	POZ	POZ	NEG	NEG	NEG	POZ
Sledi na stolu, primer V	NEG	NEG	POZ	POZ	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POZ
Sledi na penisu, primer VI	NEG	POZ	POZ	NEG	NEG	NEG	POZ	NEG	NEG	POZ

V enajstih primerih smo Myozenin-1 dokazali 6-krat, CYP2B7P1 (cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 7 pseudogene 1) 6-krat, Mucin 4 8-krat, *Lactobacillus jensenii* 8-krat, *Lactobacillus crispatus* 4-krat, *Lactobacillus gasseri* 7-krat in Humani β -defenzin 1 7-krat. Označevalcev STATH in HTN3 pričakovano nismo zasledili. Gen GAPDH smo vsakokrat pomnožili uspešno. Slike 13, 14, 15 in 16 prikazujejo elektroferograme transkriptov MYOZ1, CYP2B7P1, MUC4, HBD1, LJEN, LCRIS, in LGAS.



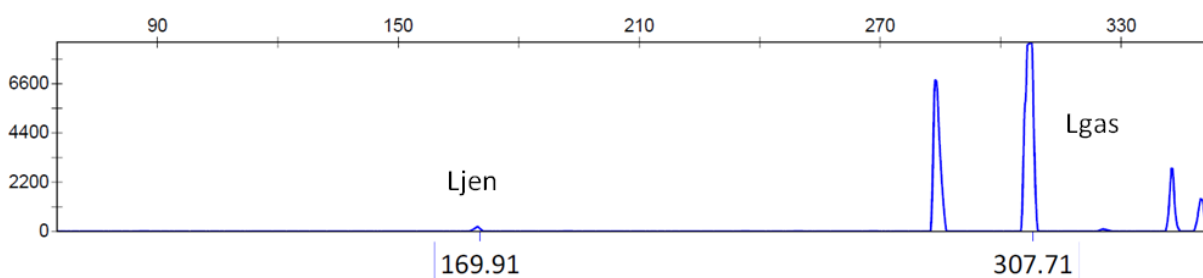
Slika 13: Elektroferogram za Vag3plex (MYOZ1, CYP2B7P1 in MUC4). Približne velikosti ampliconov 80 bp, 196 bp in 230 bp (Sočasna PCR).

Figure 13: Detection of Vag3plex (MYOZ1, CYP2B7P1 in MUC4). Approx. amplicon sizes 80 bp, 196 bp and 230 bp (multiplex PCR reaction).



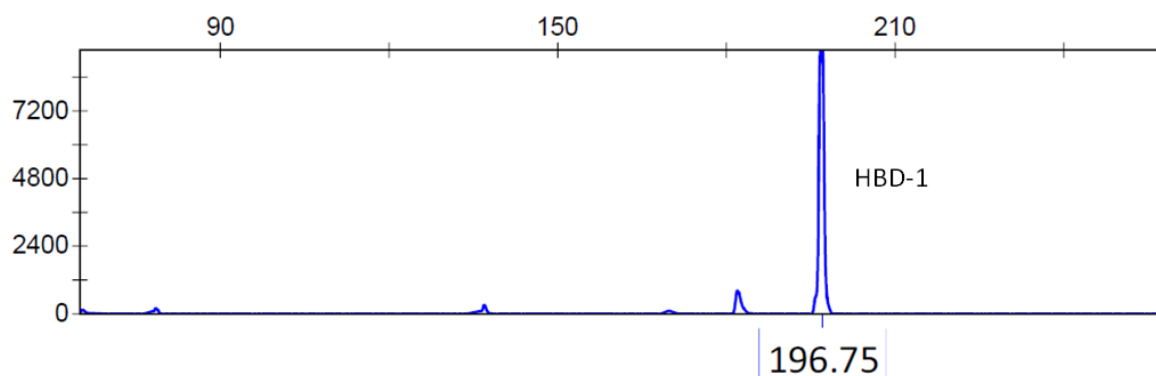
Slika 14: Elektroferogram za *Lactobacillus jensenii* (LJEN) in *Lactobacillus crispatus* (LCRIS). Približne velikosti ampliconov 170 bp in 288 bp (Sočasna PCR).

Figure 14: Detection of *Lactobacillus jensenii* (LJEN) in *Lactobacillus crispatus* (LCRIS). Approx. amplicon sizes 170 bp and 288 bp (multiplex PCR reaction).



Slika 15: Elektroferogram za *Lactobacillus jensenii* (LJEN) in *Lactobacillus gasseri* (LGAS). Približne velikosti ampliconov 170 bp in 307 bp (Sočasna PCR).

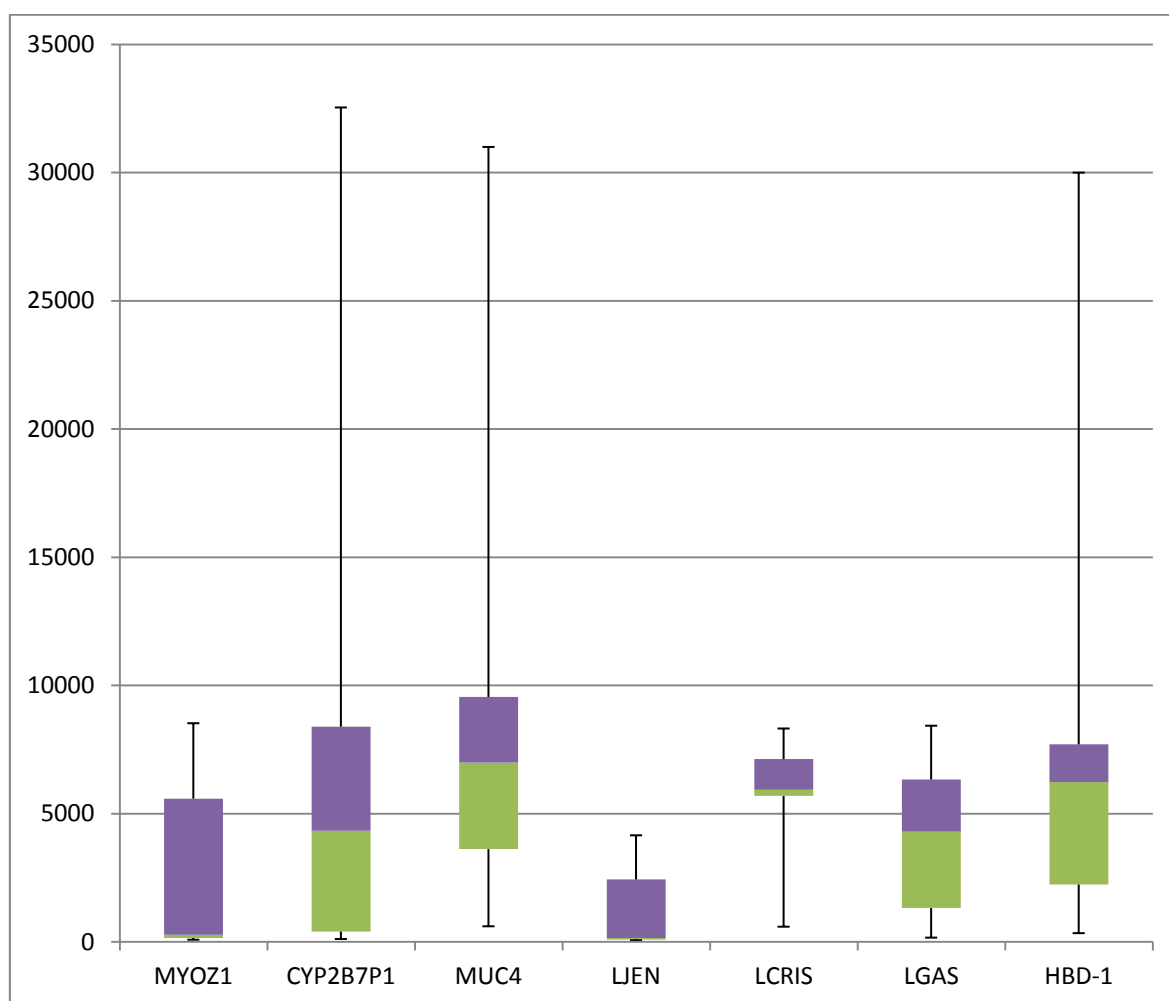
Figure 15: Detection of *Lactobacillus jensenii* (LJEN) in *Lactobacillus gasseri* (LGAS). Approx. amplicon sizes 170 bp and 307 bp (multiplex PCR reaction).



Slika 16: Elektroferogram za gen HBD1. Približna velikost amplikona 197 bp (Enojna PCR).

Figure 16: Detection of HBD1 gen. Approx. amplicon size 197 bp (single PCR reaction).

Ker nas je zanimala tudi višina RFU signalov pri tistih transkriptih, ki smo jih dokazali, iz slike 17 lahko razberemo sledeče, in sicer, da je bila najmanjša RFU vrednost za MYOZ1 85 RFU, da je bila četrtna rezultatov za MYOZ1 manjša od 152 RFU, četrtna pa večja od 5586 RFU. Polovica rezultatov za MYOZ1 je bila manjša od 283 RFU, polovica pa večja kot 283 RFU. RFU variira od 85 RFU do 8500 RFU. Najmanjša vrednost RFU signala pri CYP2B7P1 je bila 114 RFU, četrtna signalov je bila manjša od 405 RFU, četrtna pa večja kot 8400 RFU. Polovica rezultatov je bila manjša od 4300 RFU, polovica pa večja kot 4300 RFU. RFU variira od 114 RFU do 32500 RFU. Pri dokazovanju MUC 4 je bila najmanjša vrednost signala 610 RFU, četrtna rezultatov je bila pod 3620 RFU, četrtna pa večja od 9550 RFU. Polovica rezultatov je bila pod 6990 RFU, polovica pa večja od 6990 RFU. RFU variira od 610 RFU do 31000 RFU. Pri LJEN RFU variira od 66 do 4158. Najmanjša vrednost RFU je bila 66, četrtna rezultatov je imela manj od 95 RFU, četrtna pa več od 2400 RFU. Polovica rezultatov je imela RFU manj od 151, polovica pa več od 151. Polovica rezultatov pri dokazovanju LCRIS je imela RFU manjši od 5927, polovica pa večji kot 5927. Najmanjša vrednost pri dokazovanju LCRIS je imela 594 RFU, četrtna rezultatov je bila pod 5694 RFU, četrtna rezultatov pa je bila nad 7125 RFU. Pri LGAS je vrednost RFU signala variirala od 168 do 8432. Najmanjša vrednost pri LGAS je bila 168 RFU, četrtna vzorcev je imela RFU pod 1322, četrtna pa več kot 6330 RFU. Polovica rezultatov je bila pod 4300, polovica pa več kot 4300 RFU. Rezultati za dokazovanje antimikrobnega proteina urogenitalnega tkiva, HBD1, variirajo od 342 RFU do 30000 RFU. Polovica rezultatov je bila pod 6238 RFU, polovica pa nad 6238 RFU. Najmanjša vrednost je bila 342 RFU, četrtna vrednosti je bila pod 2239 RFU, četrtna pa nad 7705 RFU.



Slika 17: Okvir z ročaji za višino RFU signalov iskanih transkriptov.

Table 17: Boxplot for RFU signals and searched transcripts.

4.4 REZULTATI DNK PREISKAV

4.4.1 PCR v realnem času

Koncentracijo izolirane genomske DNK smo določili z metodo PCR v realnem času. Preglednica 10 prikazuje količino DNK v 1 μL .

Preglednica 10: Rezultati merjenja koncentracije DNK z metodo PCR v realnem času.

Figure 10: Results for DNA concentration.

Vzorec	Konc. humane DNK [ng/ μL]	Konc. moške DNK [ng/ μL]
Spodnje hlače, moški X, primer I	0,66	0,16
Sledi na penisu moškega X, primer I	0,26	0,02
Spodnje hlače, moški Y, primer I	0,27	0,17
Črne spodnje hlače, primer II	57,5	13,7
Bele spodnje hlače, primer II	1,5	0,48
Sledi na penisu, primer II	57,4	19,4
Sledi na prstih in dlaneh, primer III	4,1	2,1
Spodnje hlače moškega, primer IV	0,91	0,2
Sledi na penisu, primer IV	5,3	4,6
Sledi na stolu, primer V	15,5	0,03
Sledi na penisu, primer VI	191	0

4.4.1 Profili DNK

Produkte pomnoževanja za posamezne vzorce smo analizirali s pomočjo genetskega analizatorja 3130 in 3500 (Applied Biosystems®, Life Technologies). Pomnožene fragmente DNK, glede na njihove različne dolžine, s pomočjo električnega toka ločujemo v tanki kapilari, napolnjeni s polimerom (kapilarna elektroforeza). Področja DNK, ki smo jih preiskovali, razen amelogena (področje, ki definira spol), predstavljajo ponavljajoče se dele DNK, imenovane STR (okr. »za short tandem repeats«). To so ponovitve nekaj – običajno štiri bazne pare dolgih osnovnih enot. Razpršene so po celem človeškem genomu. Vsak posameznik ima za vsako STR področje dva različno ali enako dolga odseka DNK – alela, enega, ki ga je podedoval po materi, in drugega, ki ga je podedoval po očetu. STR aleli se označujejo s številko, ki pomeni število ponovitev osnovnega zaporedja baznih parov. Zbir analiziranih alelov predstavlja STR profil osebe oz. DNK profil za analizirana področja (Drobnič, 2004). Na penilnih brisih, dobljenih po različnih spolnih odnosih (vaginalni, analni in oralni) smo dobili biološke sledi osebe, pri katerih smo predhodno dokazali prisotnost specifične biološke sledi (vaginalni izločki in slina). Negativne rezultate pa smo dobili samo pri vzorcih, odvzetih s penisa po analnem spolnem odnosu.

Na spodnjih hlačah in penisu moškega X (primer I) ter spodnjih hlačah moškega iz primera IV, smo našli samo ženske biološke sledi. Na belih spodnjih hlačah iz primera II, prstih in dlaneh moškega iz primera III ter na penisu moškega iz primera IV, smo našli mešane biološke sledi moške in ženske osebe. Omenjene biološke sledi smo na podlagi nekaterih analitskih podatkov, predvsem višin in površin alelskih signalov na elektroferogramu, uspeli razstaviti na posamezni komponenti mešane sledi. Na črnih spodnjih hlačah

moškega Y iz primera I in moškega iz primera VI, smo našli samo njune biološke sledi. Ugotovili smo, da smo v 80 % (v 8 od 10 analiziranih vzorcev) lahko na moškemu spodnjemu perilu ali penilnem brisu dokazali prisotnost ženske osebe, katere vaginalne izločke smo predhodno dokazali z mRNK označevalci.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V prvi fazi raziskovalnega dela smo ugotavljali specifičnost in zanesljivost mRNK biomarkerjev na »čistih« vzorcih, pridobljeni od različni prostovoljcev. Gen GAPDH smo uporabili kot pozitivno kontrolo, zaradi tega, ker se konstantno in podobno izraža v različnih tkivih, ne glede na starost ali pa spol posameznika. V naši raziskavi so bile velikosti vrhov za gen GAPDH pri vseh vzorcih višje od 2500 RFU, v nekaterih vzorcih pa celo višje od 9000 RFU (mandeljni). Ker je izražanje genov GAPDH v tkivih, ki imajo večjo potrebo po energiji, večje, je višina vrhov pri vzorcih, odvzetih iz mandeljnov pričakovana (Barber in sod., 2005). Ugotovili smo, da smo mRNA biomarkerja MUC4 našli v 32 od 42 vzorcev. Naši rezultati so podobni rezultatom Gipsona in sod. (1997), Richarda in sod. (2012) ter Roeder in Haas (2012). Gipson in sod. (1997) so s hibridizacijo odtisa northern potrdili MUC4 v 2 od 4 vaginalnih vzorcev. Izražanje MUC4 je namreč v korelaciji z menstrualnim ciklom in tudi ravno estrogena in progesterona v krvi (Gipson in sod., 1999). Zanimivo je to, da so bili vsi naši vaginalni vzorci, odvzeti ženski v menopavzi, negativni za označevalec MUC4. Namreč 1/3 predmenopavznih in postmenopavznih žensk ima vaginalno suhost. Znano je, da nizke količine estrogena med menopavzo povzročajo tanjšanje vaginalnega epitelijskega, kar lahko vodi do vaginalne suhosti in atrofičnega vnetja nožnice, kar ima za posledico manj izraženega MUC4 (Huang in sod., 2010). Moncla in sod. (2014) so poročali, da ima vaginalna mikroflora večji učinek na količino MUC4, kot hormonsko stanje osebe. Ugotovili so, da je pri tistih ženskah, ki imajo bakterijsko vaginozo, povečana količina mucinov. Slednje nakazuje, da vaginalna mikroflora inducira spremembe pri izražanju mucinov. Ugotovili smo, da MUC4 ni popolnoma specifičen, saj smo ga zaznali v treh od 42 vzorcev sline. Podobne rezultate lahko opazimo pri Cossu in sod. (2009) ter Nussbaumerju in sod. (2006), ki so uporabili drugačne začetne oligonukleotide in kar v petih od 15 vzorcev sline zaznali MUC4. Za razliko poročil od Nussbaumer in sod. (2006), Cossu in sod. (2009), Roeder in Haas (2012), Richard in sod. (2012), Sakurada in sod. (2012) ter nekaterih drugih, pa Haas in sod. (2009), Lindenbergh in sod. (2012), Fleming in Harbison (2010a), Xu in sod. (2014) ter drugi avtorji, niso našli nikakršnih nespecifičnih pomnožkov MUC4 v vzorcih sline. Prav zaradi tega je zelo pomembno, da se pri ugotavljanju prisotnosti vaginalnih izločkov, poleg biomarkerja MUC4 uporabljajo še drugi biomarkerji, saj so Parka in sod. (2006) dokazali visoko biokemično in histološko podobnost med celicami ustne sluznice in vaginalnimi celicami.

Humani β -defenzin 1 smo našli v vseh vaginalnih vzorcih in 8 vzorcih sline. Podobne rezultate najdemo tudi pri Cossu in sod. (2009), Roeder in Haas (2012), Haas in sod. (2014) ter Xu in sod. (2014). Slednji so, kljub spremembi začetnih oligonukleotidov, našli HBD1 tudi v urinu, vendar samo v ženskem urinu. Valore in sod. (1998) so že poročali o tem, da se HBD1 nahaja v mnogih organih in tkivih, vendar v zelo majhnih koncentracijah, manjših kot v urogenitalnem tkivu. Rezultati naših in drugih raziskav kažejo, da izražanje HBD1 najdemo še pri analizi izvora bioloških sledi sline, menstrualne krvi in semenske tekočine (Roeder in Haas, 2012). Podobno kot pri MUC4, samo uporaba biomarkerja HBD1 za ugotavljanje prisotnosti vaginalnih izločkov ni zanesljiva.

STATH in HTN3 sta bila že uspešno uporabljena kot označevalca za ugotavljanje prisotnosti slin (Juusola in sod., 2005; Nussbaumer in sod., 2006; Noreault-Conti in Buel, 2007; Juusola in Ballantyne, 2007; Sakurada in sod., 2009; Akutsu in sod., 2010; Bowden in sod., 2011; Xu in sod., 2014). STATH in HTN3 biomarkerja smo našli samo v vzorcih slin, kar nakazuje, da sta označevalca, vsaj v naših primerih, zanesljiva in specifična. Samo Richard in sod. (2012) so poročali, da so biomarker STATH našli tudi v vaginalnih izločkih in ne samo v slini. Poročanja o nespecifičnosti biomarkerja HTN3 ni. Prav tako nobenega od menstrualnih označevalcev MMP7 in MMP11, nismo našli v vzorcih slin. Rezultati nakazujejo, da sta STATH in HTN3 zelo dobra pokazatelja za prisotnost oz. ugotavljanje slin, predvsem HTN3.

Prav tako smo testirali izražanja označevalnih genov MMP7 in MMP11 v vseh obdobjih menstrualnega cikla, saj so nekateri avtorji poročali o različnih genskih ekspresijah omenjenih genov (Nussbaumer in sod., 2006; Patel in Peel, 2008; Cossu in sod., 2009). Rezultati naših raziskav so podobni kot pri nekaterih drugih avtorjih, in sicer, da se MMP7 in MMP11 ne izražata enako med menstruacijo, saj smo MMP11 zasledili večkrat. Najverjetnejši razlog za to je, da je odstotek krvi v menstrualni tekočini razmeroma majhen in da je prisotnost krvi odvisna od (ne)uživanja kontracepcijskih tablet (Fraser in sod., 1985; Fraser in sod., 2001). Prav tako prihaja do največje izgube krvi v prvih dveh dneh menstruacije (Fraser in sod., 2001). Bauer in Patzelt (2002), Haas in sod. (2009), Richard in sod. (2011) ter Lindenbergh in sod. (2012) so pokazali, da sta biomarkerja MMP7 in MMP11 zelo uporabna za ugotavljanje prisotnosti menstrualne krvi (MK). Tudi kolaborativna EDNAP (European DNA profiling group) študija, je pokazala, da je uporaba omenjenih dveh biomarkerjev uporabna za ugotavljanje prisotnosti MK (Haas in sod., 2014). Označevalca MMP7 in MMP11 smo našli tudi v vaginalnih vzorcih, in sicer MMP7 smo našli 6-krat, MMP11 pa 8-krat. Tudi Haas in sod. (2009) so poročali o povišanem izražanju MMP11 v vaginalnih vzorcih. Glede na naravo in izvor menstrualne krvi so takšni rezultati celo pričakovani.

Podobne rezultate najdemo tudi pri Juusola in Ballantyne (2007), Haas in sod. (2009), Lukan (2010), Richard in sod. (2011) ter Roeder in Haas (2012). Za razliko od omenjenih avtorjev pa Fleming in Harbison (2010a) ter Lindenbergh in sod. (2012) niso našli nobenih nespecifičnih pomnožkov, saj so MMP7 in MMP11 našli samo v vzorcih menstrualne krvi. Pri nas je omenjen problem rešljiv, saj lahko vaginalni bris, ki prispe v NFL pred analizo, testiramo na prisotnost krvi s Hemastix reagenčnimi lističi. Značilnih razlik pri izražanju MMP7 in MMP1 med uporabo in neuporabo kontracepcije, nismo zasledili. Pri eni ženski stari 25 let, ki uporablja kontracepcijo, tretji dan njene menstruacije nismo našli označevalca MMP7, vendar tudi tretji dan menstruacije pri 29 let stari ženski, ki ne uporablja kontracepcije nismo našli označevalca MMP7. Nekateri avtorji namreč menijo, da uporaba kontracepcije vpliva na izražanje MMP7, vendar da bi dobili jasnejšo predstavbo, bi bilo potrebno narediti raziskavo na večjem številu žensk (Patel in Peel, 2008; Roeder in Haas, 2012; Park in sod., 2013). Glede občutljivosti in specifičnosti avtorji poročajo, da je MMP7 občutljivejši, medtem ko je MMP11 bolj specifičen (Lindenbergh in sod., 2012; Xu in sod., 2014). Bauer in Patzelt (2008), Haas in sod. (2009), Fleming in Harbison (2010a), Lukan (2010), Richard in sod. (2011), Lindenbergh in sod. (2012), Xu in sod. (2014) označevalcev MMP7 in MMP11 niso našli v arterijski/venozni krvi, kar

nakazuje, da je prisotnost vsaj dveh označevalcev zelo dober pokazatelj prisotnosti menstrualne krvi.

Pri ugotavljanju prisotnosti vaginalnih izločkov na penisu, po vaginalnem spolnem odnosu, smo biomarker MUC4 vedno (5/5) našli na neobrezanem penisu, medtem ko smo MUC4 pri obrezanem penisu zasledili le enkrat (1/5). Najverjetnejši razlog za to je v tem, da kožica ob glavici spolnega uda po spolnem odnosu zadrži večjo količino vaginalnega izločka. MUC4 nismo našli na moškem spolnem udu pri analnem spolnem odnosu. Pravzaprav nikakršnega označevalca nismo našli pri analnih spolnih odnosih. Razlog za to je najverjetneje v prisotnosti lubrikanta, ki v nadaljevanju inhibira pomnoževanje RNK/DNK. Pri tej analizi, ugotavljanju specifičnosti in zanesljivosti biomarkerjev na penilnih brisih, smo iskane biomarkerje našli samo v pričakovanih vzorcih. Tako smo pri analizi vzorcev, odvzetih s penisa, po oralnih spolnih odnosih, našli samo biomarkerja STATH in HTN3. Ker smo že v predhodni raziskavi ugotovili, da samo uporaba biomarkerja MUC4 za ugotavljanje prisotnosti vaginalnih izločkov ni dovolj, smo že v naslednji fazi, se pravi pri iskanju vaginalnih izločkov na penisu, uporabili še dva dodatna označevalca, in sicer STATH in HTN3. Naši rezultati so bili skladni s spolnimi odnosi, ki so bili izvedeni, se pravi, da smo pri vaginalnem spolnem odnosu našli samo MUC4, pri oralnih spolnih odnosih pa označevalca za slino STATH in HTN3, kjer pa nismo našli MUC4. Russo in sod. (2006) so poročali o prisotnosti MUC4 pri neobrezanih penisih pod kožico. Zato smo se odločili, da testiramo tudi prisotnost MUC4 v smegmi. Vsi rezultati so bili negativni (0/5). Razlog temu je lahko v dolžini pomnoževanega gena, saj je bila velikost pomnožka pri Russo in sod. (2006) 101 bp, pri nas pa 235 bp. Druga možna razlaga je lahko v sami higieni posameznika.

V času naše raziskave je potekala tudi kolaborativna EDNAP (European DNA profiling group) študija, kjer je 25 forenzičnih inštitutov iz različnih držav (Švice, Amerike, Anglije, Belgije, Nizozemske, Nove Zelandije, Norveške, Nemčije, Francije, Portugalske, Škotske, Avstrije, Španije, Slovaške, Danske, Avstralije in Italije), vključno z našim laboratorijem, testiralo uporabo mRNK biomarkerjev za identifikacijo menstrualne krvi in vaginalnih izločkov (Haas in sod., 2014). Zaradi uspešne uporabe mRNK biomarkerjev v naših predhodnih raziskavah in tudi kasneje po objavi članka Haas in sod. (2014), smo se odločili, da bomo kot prvi uporabili mRNK biomarkerje, ki so bili uporabljeni v EDNAP študiji in predhodnih drugih študijah, na realnih forenzičnih vzorcih, saj so vse objavljene študije do zdaj uporabljale čiste vzorce, odvzete prostovoljcem, ali umetno ustvarjene vzorce (nanos telesnih tekočin na različne nosilce v različnih količinah).

Če se v začetku naše razprave osredotočimo samo na vzorce iz primerov in ne na posamezen primer, ugotovimo, da smo pri ugotavljanju vaginalnih izločkov največkrat našli biomarkerja MUC4 in LJEN (8-krat), sledita mu označevalca LGAS in HBD1 (7-krat) ter označevalca MYOZ1 in CYP2B7P1 (6-krat). Najmanjkrat smo našli označevalec LCRIS, in sicer 4-krat. V nobenem od vzorcev pa nismo našli označevalcev STATH in HTN3 za ugotavljanje slin. Največje število ugotovljenih biomarkerjev oz. vseh iskanih biomarkerjev (MYOZ1, CYP2B7P1, MUC4, LJEN, LCRIS, LGAS in HBD1) na odvzeti vzorec smo našli pri dveh vzorcih, in sicer pri vzorcih odvzetih s posebno tehniko lepljenja v notranjosti spodnjih hlač, v predelu penisa. Trikrat smo našli 6 biomarkerjev (sledí, pobrane s spodnjih hlač in s penisa) in trikrat samo 3 biomarkerje. Enkrat smo našli samo 2

biomarkerja in enkrat samo enega. Vidimo, da v vseh primerih ne dobimo iskanih biomarkerjev. V prvem primeru (I), kjer sta dva moška izvedla posilstvo 16-letne ženske, smo ugotovili sledeče. Na spodnjih hlačah moškega X smo našli 6 od 7 iskanih biomarkerjev (MYOZ1, CYP2B7P1, MUC4, LJEN, LGAS in HBD1), na njegovem penisu pa samo 3 od 7 iskanih biomarkerjev (MYOZ1, LJEN in LAGS). Pri drugem moškem (Y), ki je posilil isto žensko, saj sta se pri dejanju izmenjevala, smo na njegovih spodnjih hlačah našli samo 3 od 7 iskanih biomarkerjev (MUC4, LJEN in HBD1). Edini biomarker, ki sta si ga delila oz. smo ga ugotovili pri obeh na spodnjih hlačah je bil LJEN. Razlog, da smo pri moškem X našli na spodnjih hlačah več označevalcev, je lahko v sekundarnem prenosu, se pravi, da so se sledi s penisa prenesle na spodnje hlače, saj je bil moški X obrezan. Obratno velja pri moškemu Y, imel je neobrezan penis in tako ne bi prišlo do sekundarnega prenosa bioloških sledi. Takšna razlaga bi sovpadala z našimi prej objavljenimi rezultati o prisotnosti vaginalnih izločkov na penisu po vaginalnem spolnem odnosu (Hadžić in sod., 2011). V tem delu razlage dodajmo še, da smo profil DNK ženske našli samo na penisu in spodnjih hlačah moškega X, medtem ko profila DNK ženske na spodnjih hlačah moškega Y nismo našli. Glede na postopek spolnega odnosa, kjer je zadnji končal s posiljevanjem moški Y, je ena od možnih razlag sledeča. Namreč pri nasilnem spolnem dejanju se ženske v začetku zelo močno upirajo. Prav tako je sam spolni akt napadalcu otežen, saj mu je otežena penetracija. Pri tem lahko v začetku prihaja do povečanega prenosa števila celic žrtve na penis napadalca. Kasneje se žrtev utruji in manj upira, tako da je samo nadaljevanje za naslednjega napadalca enostavnejše. Glede na to, da iščemo biomarkerje, ki se izražajo samo v določenih celicah ali pa so prisotni v večjih količinah, je povsem mogoče, da je ženskih celic tako malo, da ne dobimo njenega profila DNK, medtem ko pa je izražanje iskanega gena močno povečano in s tem dokažemo prisotnost vaginalnih označevalcev.

Iz preglednice 9 je razvidno, da smo v primeru spolnega napada na osebo, mlajšo od 15 let, primer II, dobili v preiskavo dvojce spodnjih hlač in bris penisa. Tako na penisu, kot tudi na obojih spodnjih hlačah smo ugotovili podobno število mRNK biomarkerjev. Na črnih spodnjih hlačah smo našli vseh 7 iskanih biomarkerjev, medtem, ko na penisu nismo našli LJEN in na belih spodnjih hlačah nismo našli LCRIS. V vseh treh vzorcih pa smo dobili profil DNK žrtve. V primeru III, kjer je moški s prsti prodiral v nožnico starejše ženske, smo na njegovih prstih in dlaneh našli samo *Lactobacillus jensenii* (LJEN). Samo dokaz prisotnosti *Lactobacillus jensenii* ni povsem dovolj za identifikacijo vaginalnega izločka. Namreč Haas in sod. (2014) so poročali o tem, da so nekateri laboratoriji našli *Lactobacillus jensenii* tudi v negativni kontroli. Kot razlago so navedli, da je možna okoljska kontaminacija. V našem primeru je bila negativna kontrola negativna, tako da ni šlo za kontaminacijo. Prav tako lahko *Lactobacillus jensenii* najdemo na površini telesa v bližini vagine ali pa na predmetu/penisu, ki je bil v kontaktu samo s površino vagine in kjer dejansko ni prišlo do prodiranja v nožnico. V našem primeru nam je bila prisotnost LJEN orientacijska, saj smo bili mnenja, da vaginalni izločki žrtve na storilčevi roki nimajo kaj za početi, saj smo dobili tudi profil DNK žrtve na njegovi roki. V četrtem primeru posilstva, kjer je moški posilil žensko, smo na spodnjih hlačah in penilnem brisu našli samo 3 različne biomarkerje, in sicer MUC4 in LCRIS na spodnjih hlačah ter LCRIS in LGAS na penisu. Glede na to, da sta bila biomarkerja STATH in HTN3 za dokazovanje sline negativna ter glede na dejstvo, da smo dobili mešani profil DNK (moškega in ženske) tako na spodnjih hlačah kot tudi na penisu, smo lahko zaključili, da sta osumljeni in

oškodovana imela spolne odnose. Opazimo lahko, da smo dobili na spodnjih hlačah drug biomarker kot na penisu. Kot smo že prej omenili, je lahko razlog v sekundarnem prenosu, tako da so se celice, ki so imele več mRNK gena MUC4 prenesle na spodnje hlače, na penisu pa so ostale tiste z manj izraženim genom. Možno je tudi, da je prišlo do sekundarnega prenosa *Lactobacillus gasseri* na spodnje hlače, vendar v mnogo manjšem obsegu, tako da je ostala večina bakterij na penisu.

Pri analizi brisa, odvzetega s stola, kjer je sedela ženska in se samozadovoljevala (primer IV), smo našli samo dva biomarkerja, MUC4 in LJEN. Bris s stola je bil odvzet 2 meseca po prijavi kaznivega dejanja, za katerega se je kasneje izkazalo, da ni šlo za posilstvo. Razlogov, zakaj pri analizi brisa, odvzetega s stola nismo našli več biomarkerjev, je lahko več. Najverjetnejši razlog je lahko v sami ekspresiji iskanih genov, saj fiziološko in psihološko stanje posameznika vpliva na izražanje genov, ter v sami izpostavljenosti mRNK zunanjemu okolju. Namreč Juusola in Ballantyne (2003) ter Setzer in sod. (2008) so poročali, da se stabilnost mRNK v zunanjih okoljih občutno zmanjša. Slednji so dokazali, da so MUC4 našli tudi po 180 dneh, kjer je bil vzorec zunaj, vendar ne v stiku z dežjem. V zadnjem preiskovanem primeru, primer VI, kjer je osumljeni z oškodovanko večkrat in na posebno grozovit in poniževalen način seksal, smo v preiskavo dobili samo bris penisa. Na penisu smo našli 3 mRNK biomarkerje, in sicer MUC4, CYP2B7P1 ter HBD1, vendar pa nismo dobili profila DNK oškodovanke, temveč samo profil DNK osumljenca. Zanimivo je, da v tem primeru nismo dokazali nobenega laktobacila. Tudi iz preglednice 9 je razvidno, da nam je samo 2-krat uspelo dokazati vse tri laktobacile (primer II in primer IV). Ravel in sod. (2011) ter Giampaoli in sod. (2012) so poročali, da ima vaginalna mikroflora pogosto prisotne laktobacile. Ugotovili so, da so *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri* in *L. jensenii* najbolj pogosti laktobacili pri ženskah iz različnih regij in etničnih skupin, vendar z zelo malo dokazi o njihovi koeksistenci. Za razliko od ugotovitev Ravel in sod. (2011), Giampaoli in sod. (2012) ter Haas in sod. (2014), pa smo mi večinoma pri najdbi *L. gasseri* našli še *L. crispatus* ali pa *L. jensenii*. Kljub temu, da so laktobacili dominantne bakterije vaginalne flore, se lahko njihovo število spreminja med menstrualnim ciklom, prav tako pa se lahko njihovo število zmanjša s kolonizacijo drugih mikroorganizmov (Eschenbach in sod., 1989; Keane in sod., 1997; Glupta in sod., 1998). Tako, da je povsem možno, da nobenega od laktobacilov v šestem primeru nismo dokazali, saj je mogoče, da je oseba imela povečano število *L. iners*, ki ga nismo dokazovali, ali pa je zaradi menstrualnega cikla prišlo do manjšega števila laktobacilov.

Dodajmo, da smo pri tistih vzorcih, kjer nismo dokazali *L. crispatus*, vedno našli MUC4. Naše ugotovitve kažejo sledeče, namreč Motevaseli in sod. (2013) so ugotovili, da če se zmanjša populacija *L. crispatus*, bo najverjetneje prišlo do nastanka bakterijske vaginoze. Moncola in sod. (2014) pa so ugotovili, da nastanek bakterijske vaginoze vodi do povečane ekspresije MUC4. Očitno naši rezultati podpirajo trditve Motevaseli in sod. (2013) ter Moncola in sod. (2014), saj kjer nismo dokazali *L. crispatus*, smo vedno našli MUC4. Mogoče samo dokazovanje vaginalnih izločkov z laktobacili ni povsem idealno, saj so Pabich in sod. (2003) ugotovili, da imajo ženske po menopavzi malo laktobacilov. Če pa so na hormonski terapiji pa imajo več laktobacilov. Do enakih zaključkov so prišli tudi Raz in Stamm (1993) ter Cauci in sod. (2002). Delni problem imamo tudi pri otrocih, mlajših od 11 let, saj so Hammerschlag in sod. (1978) ugotovili, da ima samo 39 % otrok, ki so preiskovali, v vagini prisotne laktobacile. Tako, da je zelo zaželeno, da v primeru, ko bi

preiskovali spolno zlorabo otrok, poleg ugotavljanja laktobacilov, uporabljamo še kakšen mRNK biomarker, saj bi ob morebitnem negativnem rezultatu za laktobacile, lahko rezultate napačno interpretirali. Za razliko od otrok pa sta Fleming in Harbison (2010b) našli *L. crispatus* in *L. gasseri* pri ženskah z različnim hormonskim ravnovesjem, pri nosečnicah, pri predmenopavznih in postmenopavznih ženskah ter pri ženskah, ki so imele histerektomijo.

Nekateri avtorji se nagibajo k temu, da je potrebno določiti, kolikšna naj bi pri interpretaciji rezultatov bila višina vrhov (RFU) (Roeder in Haas, 2012; Lindenbergh in sod., 2012; Haas in sod., 2014), kar je povsem razumljivo in sprejemljivo. Vendar povsem zanesljivega odgovora v naši raziskavi nismo našli. RFU signali transkriptov so bili od 85 RFU, pa vse do več kot 30000 RFU, seveda odvisno od preiskovanega transkripta. Znotraj istega preiskovanega transkripta je tako, recimo CYP2B7P1, najmanjša RFU vrednost 114, največja pa 32500. Povsem podobne razlike v višini RFU najdemo pri vseh transkriptih. Namreč, ker je ekspresija gena uravnavana na številnih ravneh, saj je odvisna od mnogih zunanjih kot notranjih dejavnikov, hormonskega ravnovesja, fizioloških sprememb, geografske in etične pripadnosti posameznika itd., so takšne razlike v RFU povsem pričakovane. Prav zaradi takšne razlike v RFU signalih menimo, da je potrebno pri interpretaciji RFU biti pozoren predvsem na dve stvari, in sicer koliko označevalcev je bilo dokazanih in kakšni so njihovi RFU signali. Če za primer vzamemo, da smo dokazali vseh 7 mRNK označevalcev za vaginalne izločke in so njihovi RFU signali razmeroma nizki ($100 \leq \text{RFU} \leq 1000$), bi lahko sklepali, seveda ob pogoju, da smo dobili tudi profil DNK žrtve, da smo v vzorcu našli vaginalne izločke. V primeru, kjer bi dokazali samo nekatere od 7 označevalcev in bi bili njihovi RFU signali zelo visoki ($1000 \leq \text{RFU} \leq 35000$), bi lahko tudi v tem primeru sklepali, da gre za vaginalne izločke.

Iz slik 8, 12, 13, 14, 15 in 16 opazimo, da so na elektroferogramu, poleg naših iskanih vrhov, še nekateri drugi signali. Najverjetneje gre za »vrhove presežka RNK« (ang. overflow peaks), kar pomeni, da smo imeli preveliko količino vnosa RNK in/ali cDNK. Navadno so ti vrhovi približno 10 bp manjši od pričakovanih vrhov na elektroferogramu (slike 13, 14 in 15). Omenjeni problem je rešljiv saj bi lahko PCR produkte čistili (ang. post-PCR purification) in jih eluirali v večjem volumnu ali pa vnesli manj mRNK v reakcijo obratne transkripcije.

Glede na to, da nam je uspelo izolirati zadostne količine DNK za njeno nadaljnjo analizo (Preglednica 10), opazimo, da smo izbrali ustrezno metodo, za sočasno izolacijo RNK in DNK, saj nam je v 80 % (v 8 od 10 analiziranih vzorcev) uspelo na penisu in/ali spodnjih hlačah dobiti žrtvin profil DNK. V tistih primerih, kjer pa nismo dobili profila DNK žrtve, smo pa našli nekatere mRNK označevalce (MUC4, LJEN, HBD1, CYP2B7P1), ne moremo govoriti o tem, da se na penisu in/ali spodnjih hlačah nahajajo vaginalni izločki. Enako velja za vse preiskovane označevalce oz. telesne tekočine: tam kjer nam ne uspe dobiti profila DNK žrtve, ne moremo govoriti o izvoru telesne tekočine te dotične osebe.

5.2 SKLEPI

Pri ugotavljanju uporabnosti biomarkerjev mRNK na realnih forenzičnih vzorcih nam rezultati omogočajo postavitev naslednjih sklepov:

1. mRNK biomarkerja, STATH in HTN3 sta specifična in zanesljiva za ugotavljanje prisotnosti slin, saj smo ju našli samo v vzorcih slin. Transkripta MUC4 in HBD1 smo tudi našli v vzorcih slin, kar pomeni, da samo označevalca MUC4 in HBD1 ne moremo uporabljati za ugotavljanje prisotnosti vaginalnih izločkov. Zato moramo poleg MUC4 in HBD1 obvezno uporabiti še mRNK biomarkerja za slino (STATH in HTN3). Označevalca MMP7 in MMP11 nismo našli v vzorcih slin, našli pa smo ju v menstrualni krvi in vaginalnih izločkih.
2. Za identifikacijo vaginalnih izločkov je potrebno dokazati vsaj dva mRNK označevalca iz nabora označevalcev (MYOZ1, CYP2B7P1, MUC4, LJEN, LCRIS, LGAS in HBD1), pri čemer moramo vzorec vzporedno, obvezno, testirati še na prisotnost slin z označevalcema STATH in HTN3. Za ugotavljanje prisotnosti slin je dovolj, če dokažemo samo označevalec HTN3. Pri identifikaciji menstrualne krvi je dovolj, če nam uspe dokazati vsaj enega od dveh označevalcev (MMP7 in/ali MMP11).
3. Označevalca MMP7 in MMP11 se ne izražata enako med potekom menstruacije.
4. Višina elektroforetskega signala pri kapilarni elektroforezi, kadar ugotavljamo izvor biološke sledi, je pomembna takrat, ko nam ne uspe dokazati veliko označevalcev iz nabora mRNK označevalcev MYOZ1, CYP2B7P1, MUC4, LJEN, LCRIS, LGAS in HBD1.
5. mRNK biomarkerji za vaginalne izločke (MYOZ1, CYP2B7P1, MUC4, HBD1, LJEN, LCRIS, LGAS), menstrualno kri (MMP7 in MMP11) in slino (STATH in HTN3) so uporabni za ugotavljanje izvora bioloških sledi na forenzičnih vzorcih, vendar le ob pogoju, da dobimo tudi profil DNK žrtve.
6. V večini primerov, pri sočasni izolaciji RNK in DNK, lahko ugotovimo profil DNK posameznika, se pravi donorja biološke sledi oz. telesne tekočine.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Identifikacija telesnih tekočin človeškega izvora z biomarkerji informacijske RNK (mRNK) je pomembna za forenzično delo in tudi za nadaljnje kriminalistične preiskave, saj nam omogoča rekonstrukcijo kaznivega dejanja. Konvencionalne metode za identifikacijo telesnih tekočin, kot so kemijski in morfološki testi, se še danes uporabljajo v večini rutinskih forenzičnih preiskav, vendar imajo nekatere omejitve. Ti testi namreč niso specifični, prav tako z njimi ne moremo identificirati vaginalnih izločkov in ne razločiti menstrualne in venozne/arterijske krvi. Molekularne metode z mRNK pa nasprotno omogočajo sočasno identifikacijo več različnih bioloških sledi. Dodatna prednost je ta, da lahko sočasno izoliramo mRNK in DNK. Za ugotavljanje prisotnosti vaginalnih izločkov najpogosteje dokazujemo mucin 4 (MUC4), ki ima pomembno vlogo pri reprodukciji in obrambi ženskega reproduktivnega trakta, in humani β -defenzin 1 (HBD1), ki je antimikrobni protein urogenitalnega tkiva. Poleg mucinov in HBD1, pri dokazovanju vaginalnih izločkov iščemo še laktobacile vaginalne flore (*Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri* in *Lactobacillus crispatus*) ter MYOZ1 (miozenin-1) in CYP2B7P1 (ang. cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 7 pseudogene 1). Pri iskanju biomarkerjev za dokazovanje prisotnosti menstrualne krvi iščemo matriksne metaloproteinaze (MMP), ki so od cinka odvisne endopeptidaze in imajo osrednjo vlogo pri razvoju zarodka, morfogenezi, razmnoževanju, tkivni resorpciji in preoblikovanju. Ugotovili so, da so geni MMP7 in MMP11 primerni označevalni geni za menstrualno kri, saj se med menstruacijo izražajo v celicah maternične stene, ne pa tudi v venozni oz. arterijski krvi. Za identifikacijo sline ugotavljamo prisotnost staterina (STATH) in histatina (HTN3). Prvi vzdržuje ustrezno mineralno dinamiko sklenine, drugi pa je tudi prisoten v človeški slini in ima močno antimikotično delovanje.

V naši raziskavi smo ugotavljali ali so mRNK biomarkerji specifični in zanesljivi in koliko jih potrebujemo za identifikacijo telesne tekočine. Zanimalo nas je tudi ali se označevalna gena MMP7 in MMP11, za ugotavljanje menstrualne krvi, izražata enako med potekom menstruacije in ali je potrebno določiti minimalno višino elektroforetskega signala (RFU) pri kapilarni elektroforezi. Posebno pozornost smo namenili ugotavljanju tega, če so biomarkerji mRNK uporabni za določevanje izvora telesnih tekočin človeškega izvora na realnih forenzičnih vzorcih in ali, pri sočasni izolaciji DNK in RNK lahko ugotovimo profil DNK posameznika, se pravi donorja biološke sledi oz. telesne tekočine.

Izolacijo RNK in DNK smo izvajali sočasno. V nadaljevanju smo mRNK pomnožili v cDNK. Nato smo cDNK oz. iskane transkripte pomnoževali s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi. Dolžino PCR produktov smo določili s pomočjo genetskega analizatorja 3130 in 3500 ter podatke obdelali s programom GeneMapper® (Applied Biosystems®, Life Technologies). DNK, ki smo jo sočasno izolirali skupaj z RNK, pa smo po navodilih proizvajalca pomnoževali s kompletom AmpF ℓ STR® NGM™ kit.

Pri preučevanju specifičnosti in zanesljivosti MUC4 smo ugotovili, da MUC4 nismo našli samo v vaginalnih izločkih, temveč tudi v vzorcih sline. Podobne rezultate smo dobili pri dokazovanju HBD1. Za razliko od MUC4 in HBD1, pa smo mRNK označevalca STATH

in HTN3 našli samo v vzorcih sline. Označevalca MMP7 in MMP11 smo našli v menstrualni krvi in pri analizi vaginalnih izločkov. Vendar, glede na naravo in izvor menstrualne krvi, so taki rezultati celo pričakovani. Omenjen problem je povsem rešljiv, saj lahko vaginalni bris predhodno testiramo na kri z reagenčnim lističem Hemastix. Ob pozitivni reakciji lahko vidimo, da imamo na palčki prisotno kri. Ugotovili smo tudi, da se gena MMP7 in MMP11 med potekom menstruacije ne izražata enako. Glede na to, da STATH in HTN3 nismo našli v vaginalnih izločkih in menstrualni krvi, menimo, da je pri dokazovanju vaginalnih izločkov nujno potrebno vzorce vzporedno testirati še z biomarkerjema STATH in HTN3. Pri ugotavljanju specifičnosti in zanesljivosti MUC4, STATH in HTN3 na penilnih brisih, odvzetih po različnih spolnih odnosih, smo iskane biomarkerje našli samo v pričakovanih vzorcih. Tako smo MUC4 našli samo pri vaginalnem spolnem odnosu, STATH in HTN3 pa pri oralnem spolnem odnosu. Nobenega biomarkerja nismo našli pri analnem spolnem odnosu, najverjetneje zaradi uporabe lubrikanta. Ugotovili smo tudi, da ima pomembno vlogo obrezanost oz. neobrezanost penisa. Namreč, kožica ob glavici spolnega uda po spolnem odnosu zadrži večjo količino vaginalnega izločka.

Pri analizi spodnjih hlač in penilnih brisov osumljenih iz forenzičnih primerov smo z uporabo mRNK biomarkerjev iz EDNAP študije dobili podobne rezultate. V primeru dokazovanja vaginalnih izločkov (z označevalci MYOZ1, CYP2B7P1, MUC4, HBD1, LJEN, LCRIS, LGAS), menstrualne krvi (označevalca MMP7 in MMP11) in slino (označevalca STATH in HTN3) smo ugotovili, da so mRNK biomarkerji uporabni na forenzičnih vzorcih, vendar le ob pogoju, da dobimo tudi profil DNK žrtve. Glede samih RFU signalov menimo, da je potrebno pri interpretaciji RFU biti pozoren predvsem na dve stvari, in sicer koliko označevalcev je bilo dokazanih in kakšni so njihovi RFU signali. V veliki večini (80%), nam je poleg identifikacije telesne tekočine uspelo dobiti tudi profil DNK žrtve. Prav zaradi tega, ker se lahko zgodi, da nam pri analizi uspe dokazati iskano telesno tekočino, vendar pa ne dobimo profila DNK žrtve, je morda potrebno razmišljati o novih mRNK označevalcih. Delni problem nam morda predstavljajo markerji tudi za vaginalne izločke, ki temeljijo na dokazovanju laktobacilov, predvsem pri otrocih. Vendar, ker trenutno ni dostopnih nikakršnih komercialnih testov za ugotavljanje prisotnosti vaginalnih izločkov in menstrualne krvi, je dokazovanje telesnih tekočin s pomočjo mRNK označevalcev zelo dober pokazatelj izvora biološke sledi, medtem ko njihova nepotrditvev oz. negativni rezultati ne pomenijo, da biološka sled ne izhaja iz iskane telesne tekočine/tkiva. Prav tako glede na rezultate analiz menimo, da je zelo zaželeno, da se pri zavarovanju sledi, poleg odvzema penilnega brisa, če je le možno, odvzamejo še spodnje hlače osumljenemu.

6.2 SUMMARY

Identification of human body fluids using messenger RNA (mRNA) is important for forensic work and for further criminal investigation, because it allows to reconstruct the criminal act. Conventional methods for the identification of body fluids, such as chemical and morphological tests are still used in most routine forensic investigations, but they have some limitations. These tests are not specific, in fact we can't identify vaginal secretions and we can't distinguish between menstrual and venous/arterial blood. On the other hand

an mRNA molecular method allows simultaneous identification of several different biological traces.

An additional advantage is that that we can isolate mRNA and DNA at the same time. The most often used marker for identifying vaginal secretions is mucin 4 (MUC4), which plays an important role in reproduction and defence of the female reproductive tract, and human β -defensin 1 (HBD1), which is an antimicrobial protein of the urogenital tract. Besides identifying MUC4 and HBD1 for vaginal secretion, we also search for vaginal Lactobacilli (*Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus crispatus*), MYOZ1 (Myozenin-1) and CYP2B7P1 (cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 7 pseudogene 1). For identifying the presence of menstrual blood we search for matrix metalloproteinase (MMP), which are members of zinc dependent endopeptidases family and play a central role in the development of the embryo, morphogenesis, reproduction, tissue reabsorption and transformation. It was found that the genes MMP7 and MMP11 are suitable marker genes for the identification of menstrual blood, since they are expressed in the cells of the uterine wall during a menstrual period, but not in venous/arterial blood respectively. For identifying saliva we try to determine the presence of statherin (STATH) and histatin (HTN3). First is important for stabilizing and protecting the surface enamel and recalcification, the other is also present in human saliva, and has a strong antimycotic action.

In our study we aimed to determine whether the mRNA biomarkers are specific and reliable and how many biomarkers are needed to identify particular body fluid. We were also interested whether the marker genes MMP7 and MMP11, for determining menstrual blood, are expressed simultaneously during the menstrual period and whether it is necessary to establish the minimum electrophoretic signal (RFU) for capillary electrophoresis. Special attention was given in finding practicability of mRNA biomarkers for the determination of the human body fluids origin in real forensic samples and identifying donor of biological trace when isolating RNA/DNA simultaneously.

DNA/RNA was isolated simultaneously. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from a messenger RNA (mRNA) template in a reaction catalysed by the enzyme reverse transcriptase. Then cDNA was amplified with specific primers. The length of PCR products were determined by genetic analyzer 3130 and 3500 and the data was processed with GeneMapper® software (Applied Biosystems®, Life Technologies). DNA, which was isolated at the same time as RNA, was amplified with AmpFℓSTR® NGM™ kit, according to the manufacturer.

When examining the specificity and reliability of the MUC4, we found that MUC4 is not found only in vaginal secretions but also in saliva samples. Similar results were obtained using HBD1 marker. Unlike MUC4 and HBD1, mRNA markers STATH3 and HTN3 were only found in saliva samples. MMP7 and MMP11 markers were found in menstrual blood and vaginal secretions. However, regarding the nature and the origin of menstrual blood, such results were expected. Since we can pre-test vaginal swabs for presence of blood with Hemastix reagent strip, this obstacle can be solved. If the reaction is positive, we can see that the blood is present. We have also found that the genes MMP7 and MMP11 are not expressed in the same manner during the menstrual period. Since STATH and HTN3 were

not found in vaginal secretions and menstrual blood, we believe that for identifying vaginal secretions it is necessary to test samples in parallel with STATH and HTN3 biomarkers. In the case of penile swabs taken after different sexual intercourses, only one sample taken from circumcised penis after sex was positive and all five samples from uncircumcised penis after sex were positive for MUC4. These results were expected, since there is no foreskin in circumcised penis, which would keep vaginal secretion on the penis. During intercourse the loose skin of the intact penis slides up and down the shaft of the penis. On the outstroke the glans is partially or completely engulfed by the foreskin. Due the foreskin, we think that in uncircumcised penis after sex, when foreskin retracts, it could store vaginal secretion and that could be the reason why all samples were positive. It should be noticed that it is a considerable variation in the degree to which the foreskin retracts during erection, since in some adults the foreskin remains covering the glans until retracted by sexual activity. All results from penile swabs taken after anal sex were negative for all markers. We think that the reason for negative results lays in use of the lubricant during sexual intercourse. We got positive results for all samples taken from circumcised and uncircumcised penis after oral sex. Similar results were obtained using mRNA markers from EDNAP study analyzing suspect's underpants and penile swabs. For identifying vaginal secretions (biomarkers MYOZ1, CYP2B7P1, MUC4, HBD1, LJEN, LCRIS, LGAS), menstrual blood (biomarkers MMP7 and MMP11) and saliva (biomarkers STATH and HTN3), we have proved that mRNA biomarkers are useful in forensic samples, but only under one condition and that is, obtaining a DNA profile of the victim. We believe that it is necessary when interpreting the RFU signal to pay attention primarily on two things, how many markers have we proven and what are their RFU signals. In 80 % of our analyzed forensic cases we identified the donor of the biological stain. Since it can occur, that we can identify biological trace, but we don't get the DNA profile of the victim, we could look for other mRNA markers or other RNA/DNA isolation method. There is also a smaller problem in identifying vaginal secretions in children using vaginal *Lactobacillus* markers. However, since currently there are no commercial tests available for detection of vaginal secretions and menstrual blood, identification of body fluids through mRNA markers is very good indication of the origin of biological trace, while negative results are much less reliable. Also, according to the results of the analysis, we believe that it is highly desirable when collecting evidence in rape case, to collect suspect's underpants together with penile swab.

7 VIRI

- Akutsu T., Watanabe K., Fujinami Y., Sakurada K. 2010. Applicability of ELISA detection of statherin for forensic identification of saliva. *International Journal of Legal Medicine*, 124, 5: 493–498
- Akutsu T., Motani H., Watanabe K., Iwase H., Sakurada K. 2012. Detection of bacterial 16S ribosomal RNA genes for forensic identification of vaginal fluid. *Legal Medicine*, 14, 3: 160-162
- Alvarez M., Juusola, J., Ballantyne J. 2004. An mRNA co-isolation method for forensic casework samples. *Analytical Biochemistry*, 335, 2: 289–298
- Allery J. P., Telmon N., Mieusset R., Blanc A. in Rouge D. 2001. Cytological detection of spermatozoa: Comparison of three staining methods. *Journal of Forensic Science*, 46, 2: 349–351
- Antonio M. A., Hawes S. E., Hillier S. L. 1999. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *Journal of Infectious Diseases*, 180, 6: 1950-1956
- Azen E. A., Leutenegger W., Peters E. H. 1978. Evolutionary and dietary aspects of salivary basic (Pb) and post Pb (PPb) proteins in anthropod primates. *Nature*, 273, 5665: 775–778
- Balhorn R. 2007. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology*, 8, 9: 227
- Balk S. P., Ko Y. J., Bubley G. J. 2003. Biology of prostate-specific antigen. *Journal of Clinical Oncology*, 21, 2: 383–391
- Banerji J., Rusconi S., Schaffner W. 1981. Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*, 27, 2 Pt 1: 299-308
- Barber R. D., Harmer D. W., Coleman R. A., Clark B. J. 2005. GAPDH as a housekeeping gene: Analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological Genomics*, 21, 3: 389–395
- Bauer M., Patzelt D. 2002. Evaluation of mRNA markers for the identification of menstrual blood. *Journal of Forensic Science*, 47, 6: 1278–1282
- Bauer M., Patzelt D. 2003. Protamine mRNA as molecular marker for spermatozoa in semen stains. *International Journal of Legal Medicine*, 117, 3: 175–179
- Bauer M., Patzelt D. 2008. Identification of menstrual blood by real time RT-PCR: technical improvements and the practical value of negative test results. *Forensic Science International*, 174, 1:55-59

- Benschop C. C., Quaak F. C., Boon M. E., Sijen T., Kuiper I. 2012. Vaginal microbial flora analysis by next generation sequencing and microarrays; can microbes indicate vaginal origin in a forensic context? *International Journal of Legal Medicine*, 126, 2:303-310
- Bercier J. G., Al-Hashimi I., Haghighat N., Rees T. D., Oppenheim F. G. 1999. Salivary histatins in patients with recurrent oral candidiasis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 28, 1: 26–29
- Blandau R. J., Moghissi K. 1973. *The Biology of the Cervix*. Chicago, The University of Chicago Press: 450 str.
- Blencowe B. J. 2000. Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends in Biochemical Sciences*, 25, 3: 106-110
- Boskey E. R., Telsch K. M., Whaley K. J., Moench T. R., Cone R. A. 1999. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infection and Immunology*, 67, 10: 5170-5175
- Boucher J. C., Schurr M. J., Deretic V. 2000. Dual regulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* and sigma factor antagonism. *Molecular Microbiology*, 36, 2: 341-51
- Bowden, A., Fleming, R. in Harbison, S. 2011. A method for DNA and RNA co-extraction for use on forensic samples using the Promega DNA IQ system. *Forensic Science International. Genetic*, 5, 1: 64–68
- Brody M. S., Vijay K., Price C. W. 2001. Catalytic function of an α/β hydrolase is required for energy stress activation of the σ^B transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 183, 21: 6422–6428
- Brogden, K. A., Guthmiller, J. M. 2002. *Polymicrobial diseases*. Washington, ASM Press: 427 str.
- Brotman R. M., Shardell M. D., Gajer P., Fadrosh D., Chang K., Silver M. I., Viscidi R. P., Burke A. E., Ravel J., Gravitt P. E. 2014. Association between the vaginal microbiota, menopause status, and signs of vulvovaginal atrophy. *Menopause*, 21, 5: 450-458
- Buck M., Gallegos M. T., Studholme D. J., Guo Y., Gralla J. D. 2000. The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. *Journal of Bacteriology*, 182, 15: 4129-4136
- Caceres J. F., Kornblihtt A. R. 2002. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends in Genetics*, 18, 4: 186-193

- Cauci S., Driussi S., De Santo D., Penacchioni P., Iannicelli T., Lanzafame P., De Seta F., Quadrifoglio F., de Aloysio D., Guaschino S. 2002. Prevalence of bacterial vaginosis and vaginal flora changes in peri- and postmenopausal women. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 6: 2147–52
- Colgan D.F., Manley J.L. 1997. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes & development*, 11, 21:2755-66
- Cooper G. M. 2000. *The cell: A molecular approach* (2nd ed.). Sunderland, Sinauer Associates: 689 str.
- Cossu C., Germann U., Kratzer A., Bär W., Haas C. 2009. How specific are the vaginal secretion mRNA-markers HBD1 and MUC4. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2, 1: 536–537
- Cowell I.G. 1994. Repression versus activation in the control of gene transcription. *Trends in Biochemical Sciences*, 19, 1: 38-42
- Chaturvedi P., Singh A. P., Batra S. K. 2008. Structure, evolution, and biology of the MUC4 mucin. *The FASEB Journal*, 22, 4: 966-981
- Davidson N. O., Shelness G. S. 2000. APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annual review of nutrition*, 20: 169-93
- de la Mata M., Alonso C. R., Kadener S., Fededa J. P., Blaustein M., Pelisch F., Cramer P., Bentley D., Kornblihtt A. R. 2003. A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Molecular Cell*, 12, 2: 525-532
- Drobnič K. 2004. *Biološke sledi. V: Kriminalistika: uvod, taktika, tehnika*. Maver D. (ur.), Ljubljana, Uradni list Republike Slovenije: 413–460
- Ellegren H. 2000. Microsatellite mutations in the germline: Implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics*, 16, 12: 551–558
- Eschenbach D. A., Davick P. R., Williams B. L., Klebanoff S. J., Young-Smith K., Critchlow C. M., Holmes K. K. 1989. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 2: 251-256
- Evans R.M. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 4854: 889–895
- Falsen E., Pascual C., Sjöden B., Ohlén M., Collins M. D. 1999. Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 217–221

- Fang R., Manohar C. F., Shulse C., Brevnov M., Wong A., Petrauskene O. V. Brzoska P., Furtado M. R. 2006. Real-time PCR assays for the detection of tissue and body fluid specific mRNAs. *International Congress Series*, 1288, 685–687
- Fleming R. I., Harbison, S. 2010a. The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids. *Forensic Science International. Genetic*, 4, 4: 244–256
- Fleming R. I., Harbison S. 2010b. The use of bacteria for the identification of vaginal secretions. *Forensic Science International. Genetic*, 4, 5: 311–315
- Fraser I. S., McCarron G., Markham R., Resta T. 1985. Blood and total fluid content of menstrual discharge. *Obstetrics and Gynecology*, 65, 2: 194–198
- Fraser I. S., Warner P., Marantos, P. A. 2001. Estimating menstrual blood loss in women with normal and excessive menstrual fluid volume. *Obstetrics and Gynecology*, 98, 5: 806–814
- Gasser F., Mandel M., Rogosa M. 1970. *Lactobacillus jensenii* sp. nov., a New Representative of the subgenus *Thermobacterium*. *Journal of General Microbiology*, 62, 2: 219–22
- Giampaoli S., Berti A., Valeriani F., Gianfranceschi G., Piccolella A., Buggiotti L., Rapone C., Valentini A., Ripani L., Romano Spica V. 2012. Molecular identification of vaginal fluid by microbial signature. *Forensic Science International: Genetics*, 6, 5: 559–564
- Gipson I. K., Ho S. B., Spurr-Michaud S. J., Tisdale A. S., Zhan Q., Torlakovic E., Pudney J., Anderson D. J., Toribara N. W., Hill J. A. 1997. Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biology of Reproduction*, 56, 4: 999–1011
- Gipson I. K., Spurr-Michaud S., Moccia R., Zhan Q., Toribar N., Ho S.B., Gargiulo A. R., Hill J.A. III. 1999. MUC 4 and MUC5 transcripts are prevalent mucin messenger ribonucleic acid of the human endocervix. *Biology of Reproduction*, 60, 1: 58–64
- Grant F. J., Taylor D. A., Sheppard P. O., Mathewes S. L., Lint W., Vanaja E., Bishop P. D., O'Hara P. J. 1994. Molecular cloning and characterization of a novel transglutaminase cDNA from a human prostate cDNA library. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 203, 2: 1117–1123
- Gupta K., Stapleton A. E., Hooton T. M., Roberts P. L., Fennell C. L., Stamm W. E. 1998. Inverse association of H₂O₂-producing lactobacilli and vaginal *Escherichia coli* colonization in women with recurrent urinary tract infections. *The Journal of Infectious Disease*, 178, 2: 446–450

- Haas C., Hanson E., Anjos M. J., Ballantyne K. N., Banemann R., Bhoelai B., Borges E., Carvalho M., Courts C., De Cock G., Drobnič K., Dötsch M., Fleming R., Franchi C., Gomes I., Hadžić G., Harbison S. A., Harteveld J., Hjort B., Hollard C., Hoff-Olsen P., Hüls C., Keyser C., Maroñas O., McCallum N., Moore D., Morling N., Niederstätter H., Noël F., Parson W., Phillips C., Popielarz C., Roeder A. D., Salvaderi L., Sauer E., Schneider P. M., Shanthan G., Court D. S., Turanská M., van Oorschot R. A., Vennemann M., Vidaki A., Zatkalíková L., Ballantyne J. 2014. RNA/DNA co-analysis from human menstrual blood and vaginal secretion stains: results of a fourth and fifth collaborative EDNAP exercise. *Forensic Science International. Genetic*, 8, 1: 203–212
- Haas C., Klessner B., Maake C., Bär W., Kratzer A. 2009. mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. *Forensic Science International. Genetic*, 3, 2: 80–88
- Hadžić G., Lukan A., Drobnič, K. 2011. Practical value of the marker MUC4 for identification of vaginal secretion in penile swabs. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3, 1: 222–223
- Hafez E. S. E. 1980. *Human Reproduction. Conception and Contraception*. Hagerstown, Harper and Row: 550 str.
- Hammerschlag M. R., Alpert S., Rosner I., Thurston P., Semine D., McComb D., McCormack W. M. 1978. Microbiology of the vagina in children: normal and potentially pathogenic organisms. *Pediatrics*, 62, 1: 57-62
- Hansona E. K., Ballantyne, J. 2013. Highly specific mRNA biomarkers for the identification of vaginal secretions in sexual assault investigations. *Science & Justice: Journal of the Forensic Science Society*, 53, 1: 14–22
- Hastings M. L., Krainer A. R. 2001. PremRNA splicing in the new millennium. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 3: 302-309
- Hawkins S. M, Matzuk M. M. 2008. The menstrual cycle: basic biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1135: 10-18
- Hay D. I. 1973. The isolation from human parotid saliva of a tyrosine-rich acidic peptide which exhibits high affinity for hydroxyapatite surfaces. *Archives of Oral Biology*, 18, 12: 1531–1541
- Hay D. I., Schlesinger, D. H. 1977. Human salivary statherin. A peptide inhibitor of calcium phosphate precipitation. V: Calcium binding proteins and calcium function. Wassermann R. H. (Ed.). New York, Elsevier: str. 401–408

- Hay D. I., Smith, D. J., Schluckebier, S. K., Moreno, E. C. 1984. Relationship between concentration of human salivary statherin and inhibition of calcium phosphate precipitation in stimulated human parotid saliva. *Journal of Dental Research*, 63, 6: 857–863
- Hedman J., Dalin E., Rasmusson B. Ansell R. 2001. Evaluation of amylase testing as a tool for saliva screening of crime scene trace swabs. *Forensic Science International. Genetic*, 5, 3: 194–198
- Helmerhorst E. J., van t'Hof W., Veerman E., Simons-Smit I. 1997. Synthetic histatin analogues with broad spectrum antimicrobial activity. *The Biochemical Journal*, 326 (Pt 1): 39-45
- Heller C. G., Clermont Y. 1963. Spermatogenesis in man: An estimate of its duration. *Science*, 140, 3563: 184–186
- Hermon D., Shpitzen M., Oz, C., Glattstein B., Azoury M., Gafny, R. 2003. Use of the hexagon OBTI test for detection of human blood at crime scenes and on items of evidence. Part I: Validation studies and implementation. *Journal of Forensic Identification*, 53, 5: 566–575
- Herzog Velikonja B., Gruden K. 2000. *Praktikum iz molekularne biologije - teoretični del*. Ljubljana, ŠOU – Študentska založba: 104 str.
- Hollingsworth M. A., Swanson B. J. 2004. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature reviews: Cancer* 4, 1: 45-60
- Huang A. J., Moore E. E., Boyko E. J., Scholes D., Lin F., Vittinghoff E., Fihn S. D. 2010. Vaginal symptoms in postmenopausal women: self-reported severity, natural history, and risk factors. *Menopause*, 17, 1:121-126
- Itoh H., Kishore A. H., Lindqvist A., Rogers D. E., Word R. A. 2012. Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) and progesterone regulate matrix metalloproteinases (MMP) in human endometrial stromal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97, 6: E888-E897
- Itoh H., Uchida M., Sashihara T., Ji Z. S., Li J., Tang Q., Ni S., Song L., Kaminogawa S. 2011. *Lactobacillus gasseri* OLL2809 is effective especially on the menstrual pain and dysmenorrhea in endometriosis patients: randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Cytotechnology*, 63, 2: 153-161
- Jakubowska J., Maciejewska A., Pawłowski R., Bielawski K. P. 2013. mRNA profiling for vaginal fluid and menstrual blood identification. *Forensic Science International: Genetics*, 7, 2: 272-278

- Johnson D. A., Yeh C. K., Dodds M. W. 2000. Effect of donor age on the concentrations of histatins in human parotid and submandibular/sublingual saliva. *Archives of Oral Biology*, 45, 9: 731–740
- Juusola J., Ballantyne J. 2005. Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. *Forensic Science International*, 152, 1: 1–12
- Juusola J., Ballantyne, J. 2003. Messenger RNA profiling: A prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. *Forensic Science International*, 135, 2: 85–96
- Kadonaga J.T. 2004. Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell*, 116, 2: 247–257
- Kadonaga J.T., Tjian R. 1986. Affinity of Sequence-Specific DNA Binding Proteins. *Proceedings of the National Academy of Science*, 83, 16: 5889–5893
- Kavanagh K., Dowd S. 2004. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56, 3: 285–289
- Keane F. E., Ison C. A., Taylor-Robinson D. 1997. A longitudinal study of the vaginal flora over a menstrual cycle. *International Journal of STD & AIDS*, 8, 8: 489–494
- Kornberg R. D., Lorch, Y. 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, 98, 3: 285–294
- Kramer A. 1996. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annual Review of Biochemistry*, 65: 367–409
- Laffan A., Sawyer I., Quinones I., Daniel, B. 2011. Evaluation of semen presumptive tests for use at crime scenes. *Medicine, Science, and the Law*, 51, 1: 11–17
- Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., ... Chen Y. J. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 6822: 860–921
- Lewin B. 2000. *Genes VII*. New York, Oxford University Press: 990 str.
- Lindenbergh A., de Pagter M., Ramdayal G. Visser M., Zubakov D., Kayser M., Sijen T. 2012. A multiplex (m)RNA-profiling system for the forensic identification of body fluids and contact traces. *Forensic Science International. Genetics*, 6, 5: 565–577
- Liu B., Lague J. R., Nunes D. P., Toselli P., Oppenheim F. G., Soares R. V., Troxler R. F., Offner G. D. 2002. Expression of membrane-associated mucins MUC1 and MUC4 in major human salivary glands. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50, 6: 811–820

- Lukan A. 2010. Analiza občutljivosti testa na osnovi mRNA za določanje menstrualne krvi in vaginalnih izločkov v bioloških sledeh. Diplomsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 126 str.
- Lundwall A., Bjartell A., Olsson A. Y., Malm, J. 2002. Semenogelin I and II, the predominant human seminal plasma proteins, are also expressed in non-genital tissues. *Molecular Human Reproduction*, 8, 9: 805–810
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2000. Brock biology of microorganisms 9th ed. Upper Saddle River, NJ, Prentice Hall: 1046 str.
- Mitchell C., Manhart L. E., Thomas K., Fiedler T., Fredricks D. N., Marrazzo J. 2012. Behavioral predictors of colonization with *Lactobacillus crispatus* or *Lactobacillus jensenii* after treatment for bacterial vaginosis: a cohort study. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2012: 706540
- Moncla B. J., Chappell C., Debo B. M., Macio I. S., Bunge K. E., Hillier S. L. 2014. The Effects of Hormones and Vaginal Microflora on the Content of MUC1, MUC4, MUC5AC and MUC7 in the Cervicovaginal Fluid (CVF). *AIDS Research and Human Retroviruses*, 30, S1: A29-A29
- Moniaux N., Escande F., Porchet N., Aubert J. P., Batra S. K. 2001. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*, doi 10.2741/A579: 14 str.
- Moreau P., Hen R., Wasylyk B., Everett R., Gaub M. P., Chambon P. 1981. The SV40 72 base repair repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants. *Nucleic Acids Research*, 9, 22: 6047–6068
- Motevaseli E., Shirzad M., Raoofian R., Hasheminasab S. M., Hatami M., Dianatpour M., Modarressi M. H. 2013. Differences in vaginal lactobacilli composition of Iranian healthy and bacterial vaginosis infected women: a comparative analysis of their cytotoxic effects with commercial vaginal probiotics. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 15, 3: 199–206
- Nair A. R., Taylor H. S. 2010. The Mechanism of Menstruation. V: Amenorrhea A Case-Based, Clinical Guide. Santoro N. F, Neal-Perry G. (eds.). New York, Springer Science+Business Media: 21-34
- Nelson D. L., Cox, M. M. 2004. Lehninger principles of biochemistry (4th ed.). San Francisco, W. H. Freeman: 1119 str.
- Nilsen T. W. 2000. The case for an RNA enzyme. *Nature*, 408: 782-783
- Noreault-Conti T.L., Buel E. 2007. The use of real-time PCR for forensic stain identification. *Promega Profiles DNA*, 10: 3-5

- Nussbaumer C., Gharehbaghi-Schnell E., Korschineck, I. 2006. Messenger RNA profiling: A novel method for body fluid identification by real-time PCR. *Forensic Science International*, 157, 2–3: 181–186
- Oppenheim F. G., Xu T., McMillian F. M., Levitz S. M., Diamond R. D., Offner G. D., Troxler R. F. 1988. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 16: 7472–7477
- Pabich W. L., Fihn S. D., Stamm W. E., Scholes D., Boyko E. J., Gupta K. 2003. Prevalence and determinants of vaginal flora alterations in postmenopausal women. *The Journal of Infectious Diseases*, 188, 7: 1054–1058
- Park N. J., Li Y., Yu T., Brinkman B. M. N., Wong, D. T. 2006. Characterization of RNA in saliva. *Clinical Chemistry*, 52, 6: 988–994
- Park S. M., Park S. Y., Kim J. H., Kang T. W., Park J. L., Woo K. M., Kim J. S., Lee H. C., Kim S. Y., Lee S. H. 2013. Genome-wide mRNA profiling and multiplex quantitative RT-PCR for forensic body fluid identification. *Forensic Science International: Genetics*, 7, 1: 143–150
- Patel G., Peel C. 2008. Identifying the origin of cells. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1: 536–537
- Piszczałowski R. T., Rafferty B. J., Rozado A., Tobak S., Lents N. H. 2014. The glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) is regulated by myeloid zinc finger 1 (MZF-1) and is induced by calcitriol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 451, 1: 137–141
- Poon H., Elliott J., Modler J., Frégeau C. 2009. The use of hemastix ® and the subsequent lack of DNA recovery using the promega DNA IQ™ system. *Journal of the Forensic Sciences*, 54, 6: 1278–1286
- Raj P. A., Johnsson M., Levine M. J., Nancollas, G. H. 1992. Salivary statherin: Dependence on sequence, charge, hydrogen bonding potency, and helical conformation for adsorption to hydroxyapatite and inhibition of mineralization. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 9: 5968–5976
- Ravel J., Gajer P., Abdo Z., Schneider G. M., Koenig S. S., McCulle S. L., Karlebach S., Gorle R., Russell J., Tacket C. O., Brotman R. M., Davis C. C., Ault K., Peralta L., Forney L. J. 2011. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, Suppl 1: 4680–4687
- Raz R., Stamm W. E. 1993. A controlled trial of intravaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infections. *The New England Journal of Medicine*, 329, 11: 753–756

- Richard M. L., Harper K. A., Craig R. L., Onorato A. J., Robertson J. M., Donfack J. 2012. Evaluation of mRNA marker specificity for the identification of five human body fluids by capillary electrophoresis. *Forensic Science International: Genetics*, 6, 4: 452-460
- Roberts G. C., Gooding C., Mak H. Y., Proudfoot N. J., Smith C. W. 1998. Cotranscriptional commitment to alternative splice site selection. *Nucleic Acids Research*. 26, 24: 5568-5572
- Roeder A. D., Haas, C. 2012. mRNA profiling using a minimum of five mRNA markers per body fluid and a novel scoring method for body fluid identification. *International Journal of Legal Medicine*, 127, 4: 707–721
- Roeder R. G., Schwartz L. B., Sklar V. E. 1976. Function, structure, and regulation of eukaryotic nuclear RNA polymerases. *The symposium/The Society for developmental Biology*. Symposium, 34:29-52
- Roeder R.G., Rutter W.J. 1969. Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature*, 224, 5216:234-237
- Rogers P. A., Abberton K. M. 2003. Endometrial arteriogenesis: vascular smooth muscle cell proliferation and differentiation during the menstrual cycle and changes associated with endometrial bleeding disorders. *Microscopy Research and Technique*, 60, 4: 412–419
- Rosenthal E.T., Ruderman J.V. 1987. Widespread changes in the translation and adenylation of maternal messenger RNAs following fertilization of *Spisula* oocytes. *Developmental biology*, 121(1):237-46
- Russo C. L., Spurr-Michaud S., Tisdale A., Pudney J., Anderson D., Gipson I. K. 2006. Mucin gene expression in human male urogenital tract epithelia. *Human reproduction*, 21, 11: 2783-2793
- Sackmann E. 1995. Biological membranes architecture and function: Handbook of biological physics (1st ed.). München, Elsevier: 1052 str.
- Sakurada K., Ikegaya H., Fukushima H., Akutsu T., Watanabe K., Yoshino, M. 2009. Evaluation of mRNA-based approach for identification of saliva and semen. *Legal Medicine*, 211, 3: 125–128
- Sanford J. R., Caceres J. F. 2004. Pre-mRNA splicing: life at the centre of the central dogma. *Journal of cell science*, 117, Pt 26: 6261-6263
- Satoh S., Hinoda Y., Hayashi T., Burdick M. D., Imai K., Hollingsworth M. A. 2000. Enhancement of metastatic properties of pancreatic cancer cells by MUC1 gene encoding an anti-adhesion molecule. *International Journal of Cancer*, 88, 4: 507-518

- Schlötterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, 6: 365–371
- Sentenac A. 1985. Eukaryotic RNA polymerases. *CRC Critical Reviews Biochemistry*, 18, 1:31-90
- Setzer M., Juusola J., Ballantyne J. 2008. Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains. *Journal of the Forensic Sciences*, 53, 2: 296–305
- Shilatifard A. 2006. Chromatin Modifications by Methylation and Ubiquitination: Implications in the Regulation of Gene Expression. *Annual Review of Biochemistry*, 75: 243-69
- Smith C. W., Valcarcel J. 2000. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends in biochemical sciences*, 25, 8: 381-388
- St Amant D. C., Valentin-Bon I. E., Jerse A. E. 2002. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by *Lactobacillus* species that are commonly isolated from the female genital tract. *Infection and Immunity*, 70, 12: 7169-7171
- Stamm S. 2002. Signals and their transduction pathways regulating alternative splicing: a new dimension of the human genome. *Human Molecular Genetics*, 11, 20: 2409-2416
- Steger K., Pauls K., Klonisch T., Franke F. E. Bergmann M. 2000. Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Molecular Human Reproduction*, 6, 3: 219–225
- Stušek P. 2003. *Biologija človeka* (1. izd.). Ljubljana, DZS: 323 str.
- Tailliez P. 2004. *Lactobacilli: properties, habitats, physiological role and importance in human health*. *Antibiotiques*, 6, 1: 35-41
- Tautz D. 1993. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. V Pena, S. D. J. R., Chakraborty, R., Epplen, J. T. in Jeffreys, A. J. (ur.). *DNA fingerprinting* (str. 21–28). Basel: Birkhäuser Verlag
- Thiel G., Lietz M., Hohl M. 2004. How mammalian transcriptional repressors work. *European Journal of Biochemistry*, 271, 14: 2855-62
- Tomšič A., Bilban M., Drobnič M. 2014. Influence of Menstrual Cycle on Anterior Cruciate Ligament Injuries in the Knee: A Systematic Review of the Literature. *Slovenian Journal of Public Health*, 53, 3: 270–274
- Valore E. V., Park C. H., Quayle A. J., Wiles K. R., McCray P. B. Jr., Ganz T. 1998. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *Journal of Clinical Investigation*, 101, 8: 1633–1642

- Van der Spek J. C., Wyandt H. E., Skare J. C., Milunsky A., Oppenheim F. G., Troxler, R. F. 1989. Localization of the genes for histatins to human chromosome 4q13 and tissue distribution of the mRNAs. *The American Journal of Human Genetics*, 45, 3: 381–387
- Van Ness B., Fulton R. 1994. Selective synergy of immunoglobulin enhancer elements in B-cell development: a characteristic of kappa light chain enhancers, but not heavy chain enhancers. *Nucleic Acids Research*, 22, 20: 4216–4223
- Vassalli J.-D., Stutz A. 1995. Translational Control: Awakening dormant mRNAs. *Current Biology*, 5, 5: 476–479
- Virkler K., Lednev I. K. 2009. Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Science International*, 188, 1–3: 1–17
- Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. Ljubljana, DZS: 552 str.
- Wei C.-M., Moss B. 1977. 5'-Terminal capping of RNA by guanylyltransferase from HeLa cell nuclei. (mRNA/7-methylguanosine/RNA processing). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 9: 3758-3761
- Wesseling J., van der Valk S. W., Vos H. L., Sonnenberg A., Hilkens J. 1995. Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *Journal of Cell Biology*, 129, 1: 255-265
- Will C. L., Lührmann R. 2011. Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3,7: a003707
- Woessner J. F., Nagase H. 2000. Matrix metalloproteinases and timsps. Oxford, Oxford University Press: 223 str.
- Wormington M. 1993. Poly(A) and translation: development control. *Current Opinion in Cell Biology*, 5, 6: 950–954
- Xu Y., Xie J., Cao Y., Zhou H., Ping Y., Chen L., Gu L., Hu W., Bi G., Ge J., Chen X., Zhao Z. 2014. Development of highly sensitive and specific mRNA multiplex system (XCYR1) for forensic human body fluids and tissues identification. *PloS One*, 9, 7: e100123
- Yean D., Gralla J. 1996. Transcription activation by GC-boxes: evaluation of kinetic and equilibrium contributions. *Nucleic Acids Research*, 24, 14: 2723–2729
- Zhang X., Nothnick W. B. 2005. The role and regulation of the uterine matrix metalloproteinase system in menstruating and non-menstruating species. *Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library*, 10: 353-366

Zubakov D., Hanekamp E., Kokshoorn M., van Ijcken W., Kayser, M. 2008. Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples. *International Journal of Legal Medicine*, 122, 2: 135–142

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Katji Drobnič, ki mi je pomagala in svetovala ter vedno našla čas in prave besede, ki so omogočile nastanek te magistrske naloge. Prav tako bi se rad zahvalil sodelavcem in sodelavkam, ki so bili tudi del te naloge.

Na koncu se moram zahvaliti tudi družini, ki mi je ves čas študija stala ob strani in me na tej poti podpirala.