

Identifikacija telesnih tekočin človeškega izvora z biomarkerji informacijske RNK

Gavril Hadžić,¹ Katja Drobnič²

Identifikacija telesnih tekočin človeškega izvora z biomarkerji informacijske RNK (mRNK) je pomembna za forenzično delo in tudi za nadaljnje kriminalistične preiskave, saj nam omogoča 'vpogled' v dogodke 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 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. Odkriti so bili številni markerji mRNK, ki so specifični za določeno telesno tekočino. Najnovejše raziskave so pokazale, da je mogoče učinkovito izolirati mRNK tudi iz starejših forenzičnih vzorcev. V tem članku bomo predstavili splošen pregled stanja na tem področju in najnovejše biomarkerje mRNK. Predstavili bomo tudi rezultate raziskav Nacionalnega forenzičnega laboratorija in njihovo uporabnost za razreševanje kaznivih dejanj, še posebej s področja spolnega nasilja.

Glavne besede: identifikacija telesnih tekočin, mRNK, vaginalni izločki, MUC4, Statherin, Histatin 3, menstrualna kri, MMP7, laktobacili

UDK: 343.983.2

1 Uvod

Identifikacija³ oziroma določitev vrste in izvora biološke sledi je pri preiskovanju kaznivih dejanj, predvsem pri seksualnih deliktih, navadno ključnega pomena za razjasnitev okoliščin, za določitev vrste kaznivega dejanja (spolno nasilje, posilstvo ...) in obsega kazni. V forenzičnem laboratoriju se splošno začne preiskovanje materiala, zavarovanega na kraju kaznivega dejanja ali pa povezanega z njim (predmeti osumljenca ...), z iskanjem bioloških sledi, čemur sledi identifikacijski postopek. Iskanje biološke sledi poteka s prostimi očmi ali z uporabo forenzičnega vira svetlobe, identifikacija pa z različnimi metodami. Konvencionalne metode za določanje vrste biološkega izvora oziroma identifikacijo biološke sledi delimo na encimske, imunološke in morfološke (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, Telmon, Mieusset, Blanc in Rouge, 2001). Na trgu je trenutno dostopnih kar nekaj komercialnih preliminarne in potrditvenih testov za identifikacijo krvi, semenske tekočine in slin. V splošnem laboratoriju za preliminarno določanje krvi uporabljajo t. i. reagenčne lističe Hemastix⁴, ki so bili primarno razviti za potrjevanje prisotnosti ali odsotnosti krvi v urinu. Test temelji na peroksidazi – 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 et al., 2009). Slabosti omenjenega testa so, da ni specifičen za človeka in da daje lažno pozitivne rezultate z nekaterimi drugimi oksidirajočimi substancami. Poleg omenjenega nespecifičnega testa lahko za določevanje krvi uporabimo 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

¹ Gavril Hadžić, univ. dipl. mikrobiol., je kriminalističnotehnični izvedenec, Nacionalni forenzični laboratorij, Generalna policijska uprava, Ministrstvo za notranje zadeve, Slovenija. E-pošta: gavril.hadzic@policijska.si

² Dr. Katja Drobnič je redna profesorica za forenzično znanost, Fakulteta za varnostne vede Univerze v Mariboru, in vodja Oddelka za biologijo, Nacionalni forenzični laboratorij, Generalna policijska uprava, Ministrstvo za notranje zadeve, Slovenija. E-pošta: katja.drobnic@policijska.si.

³ Identifikacija pomeni določitev fizikalno-kemijskih značilnosti biološke sledi oziroma določitev vrste telesne tekočine, iz katere izvira (Virkler in Lednev, 2009).

⁴ Hemastix reagenčni listič je preliminarni test za ugotavljanje prisotnosti krvi (Poon, Elliott, Modler, Frégeau, 2009).

protitelo⁵, ki je specifično za hHb (Vozelj, 2000). Nastali imunokompleks (kompleks protitelesa in antigena) na podlagi kapilarnega učinka potuje do testne cone, kjer ga »ujame« drugo, tokrat imobilizirano anti-hHb protitelo. Nad določeno koncentracijo hHb v vzorcu (0,05 µg/ml) v testnem območju 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. To pomeni, da ne omogoča razlikovanja med menstrualno krvjo in venozno/arterijsko krvjo. Omenjeni test pokaže tudi lažno pozitivne rezultate s krvjo primatov (Hermon et al., 2003), kar pa v srednje evropskem prostoru običajno ni težava.

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 KM⁶) ali pa potrditvenim imunokromatografskim (komercialno ime PSA Check 1⁷) testom. Ta 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 trgu predstavil eden od zasebnih forenzičnih laboratorijev Independent Forensics. Omenjeni test namesto PSA proteina⁸, na katerem temelji PSA Check test, detektira prisotnost semenogelina⁹, ki je v semenski tekočini (Balk, Ko in Bubley, 2003; Laffan, Sawyer, Quinones in Daniel, 2011; Lundwall, Bjartell, Olsson in Malm, 2002).

Težava 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 bodisi na spodnjih hlačah osumljenca. Trenutno ni na voljo klasičnih potrditvenih encimskih ali pa imunoloških testov za identifikacijo vaginalnih izločkov.

Poleg ugotavljanja krvi in semenske tekočine je dokazovanje slin še posebej pomembno pri tistih kaznivih dejanjih, pri katerih je treba dokazati, da sled na telesu izvira iz slin in ne iz drugih bioloških sledi. Trenutno se slina najpogosteje ugotavlja z enostavnim nespecifičnim komercialnim testom Phadebas[®]. Test temelji na aktivnosti encima α -amilaza¹⁰, ki škrob hidrolizira v maltozo. Prav to hidrolizo škroba v maltozo uporabljamo za potrditev slin. Reagenti listi Phadebas[®] so prepojeni s škrobnimi mikrozrcni, 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 slin nastane moder madež (Hedman et al., 2001). S podobnimi težavami, kot že pri prej omenjenih nespecifičnih testih, se srečujemo tudi pri dokazovanju slin.

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). Zaradi vseh naštetih slabosti pri konvencionalnih postopkih ugotavljanja izvora bioloških sledi se za identifikacijo biološke sledi v zadnjem času uveljavljajo biomarkerji informacijske RNK (mRNK¹¹) (Cooper, 2000).

1.1 Deoksiribonukleinska kislina (DNK oziroma DNA)

Celice istega izvora, ki so si podobne in ki opravljajo enake naloge, so združene v tkiva. Različna tkiva se združujejo v večje enote, ki opravljajo določene naloge in jih imenujemo organi. Različni organi pripadajo različnim organskim sistemom, ki tvorijo nek organizem. To so t. i. organizacijske ravni, ki predstavljajo funkcionalno organizacijo človeškega telesa (Stušek, 2003). Vsaka človeška celica, razen zrelih eritrocitov, vsebuje DNK (deoksiribonukleinska kislina), ki je organizirana v kromosom in je v jedru celice (Sackmann, 1995). 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 ži-

⁵ Protitelo je topna glikoproteinska molekula iz skupine imunoglobulinov, ki se veže na tujke in jim s tem prepreči, da bi škodovali organizmu (Cooper, 2000).

⁶ Phosphatesmo KM je preliminarni test za identifikacijo sledov semenske tekočine (Lundwall et al., 2002).

⁷ PSA Semiquant test je imunokromatografski semikvantitativni hitri test za določitev prisotnosti semenske tekočine. Test deluje po enakem principu – imunokromatografskem, kot je opisan za Hexagon OBTI. Identifikacijska spojina je Glikoprotein p30 (Prostatic Specific Antigen), ki ga izločajo epitelne celice prostate in omogoča primerno viskoznost semenske tekočine ter uspešno oploditev (Lundwall et al., 2002).

⁸ Prostata-specifični antigen (PSA) je protein, ki ga izločajo epitelne celice prostate. PSA najdemo v moškem ejakulatu, saj omogoča spermijem enostavno gibanje v semenski tekočini (Lundwall et al., 2002).

⁹ Semenogelin je glavna proteinska komponenta moškega ejakulata, saj skupaj s fibronektinom da gelu podoben ejakulat (Lundwall et al., 2002).

¹⁰ α -amilaza je encim, ki ga najdemo v človeški slini in je odgovoren za razgradnjo škroba v ustih (Hedman, Dalin, Rasmusson in Ansell, 2001).

¹¹ mRNK (messenger RNA) ali informacijska RNA je enoverižna nukleinska molekula, ki nosi informacijo za sintezo proteinov (Cooper, 2000).

vih organizmov in predstavlja informacijsko osnovo za njihov razvoj in delovanje. Sestavljajo jo nukleotidi, katerih ogrodek je sestavljeno iz sladkorja, fosfatne skupine in baze (Lewin, 2000). Značilnost človeške jedrne DNK je, da njen veliki del (30 %) vsebujejo različna ponavljajoča se zaporedja DNK, ki v večini primerov predstavljajo zelo polimorfna¹² področja (Ellegren, 2000; Schlötterer, 2000; Tautz, 1993). V to skupino hipervariabilnih polimorfnih področij sodijo tudi mikrosateliti ali kratke tandemske ponovitve, ki jih označujemo s kratko STR (angl. short tandem repeats). So v nekodogenih regijah DNK, torej se ne prepisujejo v proteine ali ribosome ter so po človeškem genomu raztreseni povsem naključno. In prav te označevalce STR uporabljamo v forenziki za ugotavljanje tega, čigav je vzorec biološke sledi. DNK je mogoče izolirati iz tkiva, kosti, las in telesnih tekočin (Drobnič, 2004).

1.2 Informacijska ribonukleinska kislina (mRNK)

Vsako tkivo oz. celica potrebuje za svoje delovanje določene proteine. Funkcija oz. informacija proteina je zapisana na 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). 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 mRNK molekul. 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 aminokislinsko¹³ zaporedje. Na podlagi aminokislinskega zaporedja proteina lahko ugotovimo nukle-

otidno zaporedje mRNK molekule in tudi DNK molekule oz. cDNK¹⁴ (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 kromatografijo¹⁵ na oligo-dT celulozi, pri čemer izkoriščamo lastnost večine evkariontskih mRNK molekul, da so poliadnilirane. Izolirano mRNK pozneje v postopku prepišemo v cDNK (Nelson in Cox, 2004). Specifičnost tkivno označevalnega gena oz. iskanega gena dosežemo z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov (Herzog Velikonja in Gruden, 2000). Za forenzično najpomembnejše telesne tekočine je bilo odkritih že nekaj biomarkerjev mRNK.

2 Telesne tekočine

2.1 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) (Alvarez, Juusola in Ballantyne, 2004; Bauer in Patzelt, 2003; Haas, Klessner, Maahe, Bär in Kratzer, 2009; Juusola in Ballantyne, 2005; Roeder in Haas, 2012; Setzer, Juusola in Ballantyne, 2008; Steger, Pauls, Klonisch, Franke in Bergmann, 2000). Protamini so majhni, z argininom bogati jedrni proteini, ki zamenjajo histone¹⁶ v pozni haploidni fazi spermatogeneze¹⁷ in tako omogočijo gostejše pakiranje in stabilnost DNK v spermiju (Balhorn, 2007; Heller in Clermont, 1963; Kornberg in Lorch, 1999). Transglutaminaza 4 je encim, ki ga izloča prostata, in njegova mRNK se je izkazala kot dober označevalec za ugotavljanje prisotnosti semenske tekočine (Fang et al., 2006; Grant et al., 1994).

¹² V forenziki primerjamo sporno biološko sled z osumljencem ali oškodovancem na osnovi genetskih označevalcev z uporabo molekularno genetskih metod. Genetski označevalec je lahko katerikoli predel v genomu, kjer obstajajo razlike v zaporedju nukleotidov v DNK. Na ravni populacije se kaže ta variabilnost v razlikah med osebki znotraj populacije, vendar te razlike bistveno ne vplivajo na fenotip osebe, kljub temu pa nam razkrivajo genetsko sorodnost med osebki. Če je pojav teh razlik zelo redek, jo imenujemo mutacija, če pa so te razlike pogoste, jih imenujemo polimorfizmi (Lewin, 2000).

¹³ Aminokislino so osnovni gradniki proteinov oz. beljakovin (Cooper, 2000).

¹⁴ Komplementarna DNK (cDNK) se sintetizira iz matrične mRNK v reakciji, ki jo katalizirata dva encima, in sicer reverzna transkriptaza in DNK polimeraza (Lewin, 2000).

¹⁵ Afinitetna kromatografija je metoda ločevanja biokemičnih zmesi, ki temelji na zelo specifičnih bioloških interakcijah. Ločevanje poteka na osnovi reverzibilnih interakcij med proteini in ligandom, vezanim na inertni nosilec (Herzog Velikonja in Gruden, 2000).

¹⁶ Histon je bazična beljakovina, ki se povezuje z DNK in tvori kromosom (Cooper, 2000).

¹⁷ Spermatogeneza je proces zorenja semenčic oziroma spermijev – moških spolnih celic (Nelson in Cox, 2004).

2.2 Slina

Histatin 3 (HTN3) je s histidinom¹⁸ bogat protein, prisoten v človeški slini, ki ima močno antimikotično delovanje (Azen, Leutenegger in Peters, 1978; Oppenheim et al., 1988; Nelson in Cox, 2004; van der Spek et al., 1989). Tudi statheirin (STATH) je v človeški slini in je večopravilna molekula. Ima visoko afiniteto vezave mineralov kalcijevega fosfata, npr. hidroksiapatita¹⁹. Prav tako vzdržuje ustrezno mineralno dinamiko sklenine, pospešuje selektivno kolonizacijo bakterij in služi kot mazivo na površini sklenine (Hay, 1973; Hay in Schlesinger, 1977; Hay, Smith, Schluckebier in Moreno, 1984; Raj, Johnsson, Levine in Nancollas, 1992). Tako STATH kot tudi HTN3 sta bila uspešno uporabljena pri identifikaciji sline (Akutsu, Watanabe, Fujinami in Sakurada, 2010; Bowden, Fleming in Harbison, 2011; Juusola in Ballantyne, 2005; Nussbaumer, Gharehbaghi-Schnell in Korschneck, 2006; Sakurada et al., 2009).

2.3 Vaginalni izločki

2.3.1 Mucini

Mucini imajo veliko molekulsko maso in so večinoma glikozilirani²⁰ proteini (Cooper, 2000). Sestavljeni so iz dolgih polipeptidnih verig in krajših ogljikovih hidratov. mRNK mucina 4 je ena izmed prevladujočih mRNK urogenitalnega trakta, najdemo pa jo tudi v celicah jajcevoda, maternice, ustne votline in vagine. Imajo pomembno vlogo pri zaščiti, diferenciaciji in obnavljanju celic ter sodelujejo pri celičnem signaliziranju. Povedano drugače, mucini ščitijo površino reproduktivnega trakta pred patogenimi vstopi in pomagajo pri vходу spermijev v maternico (Gipson et al., 1997, 1999). Posebnost MUC4 je tudi ta, da je bil potrjen v epiteliju materničnega vratu in tako postal primeren označevalni gen za vaginalne izločke (Cossu, Germann, Kratzer, Bär in Haas, 2009; Haas et al., 2009; Juusola in Ballantyne, 2005; Nussbaumer et al., 2006; Setzer et al., 2008).

Nussbaumer in sodelavci (2006) so poročali, da izražanje MUC4 iz vaginalnih izločkov korelira z MUC4 v slini in da samo uporaba označevalca MUC4 za ugotavljanje vaginalnih

izločkov ni primerna. Zubakov, Hanekamp, Kokshoorn, van Ijcken in Kayser (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 sodelavcev (2002) ter Parka in sodelavcev (Park, Li, Yu, Brinkman in Wong, 2006). Zadnji so dokazali visoko biokemično in histološko podobnost med celicami ustne sluznice in vaginalnimi celicami. Cossu in sodelavci (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 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). 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. Zaradi tega, ker *L. jensenii* anaerobno presnavlja glikogen v očetno in mlečno kislino, je vaginalna flora kislila, pH 4 (Boskey, Telsch, Whaley, Moench in Cone, 1999). Ugotovljeno je bilo, da so *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri* in *Lactobacillus crispatus* oz. njihove RNK uporabne kot označevalci za vaginalne izločke oz. floro (Fleming in Harbison, 2010a; Roeder in Haas, 2012). Pozneje so v Novi Zelandiji vpeljali metodo, ki so jo rutinsko začeli uporabljati v laboratoriju za identifikacijo telesnih tekočin (Fleming in Harbison, 2010b).

Hansona in Ballantyne (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 (Haas et al., 2009; Juusola in Ballantyne, 2005).

¹⁸ Histidin je esencialna aminokislina s pozitivno nabito imidazolno funkcionalno skupino (Cooper, 2000).

¹⁹ Glavna sestavina kosti in zob je kalcijev hidroksiapatit (Nelson in Cox, 2004).

²⁰ Glikozilacija je ena najpomembnejših posttranslacijskih dogodkov, pri čemer gre za dodajanje sladkorjev na protein, na aminokislino asparagin, hidroksilizin, serin ali treonin. Protein v tem primeru postane glikoprotein. Proces je encimsko odvisen (Cooper, 2000).

2.3.3 Matriksne metaloproteinaze

Pravočasna razgradnja medceličnega prostora (ekstracelularni matriks – ECM) je bistvenega pomena za razvoj zarodka, morfogenezo,²¹ razmnoževanje, tkivno resorbcijo in preoblikovanje. Matriksne metaloproteinaze (MMP) so od cinka odvisne endopeptidaze in imajo osrednjo vlogo pri teh procesih (Woessner in Nagase, 2000). Različni avtorji v svojih člankih navajajo, da so geni MMP7, MMP10 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 (Fleming in Harbison, 2010b; Haas et al., 2009; Juusola in Ballantyne, 2005; Nussbaumer et al., 2006; Setzer et al., 2008).

3 Vpeljava nove metode v NFL

Do začetka naših raziskav so vse objavljene študije za preverjanje robustnosti, senzitivnosti in specifičnosti biomarkerjev mRNA uporabljale čiste vzorce, odvzete prostovoljcem ali umetno ustvarjene (nanos telesnih tekočin na različne nosilce v različnih količinah) (Haas et al., 2014). Rezultati izražanja nekaterih označevalnih genov so bili med laboratoriji različni, predvsem zaradi postopka izolacije. Slabost vseh testov je bila, da sta izolaciji DNK in RNK potekali z ločenima postopkoma, zaradi česar je bila za uspešnost obeh analiz potrebna večja količina vzorca, ki v realnih primerih mnogokrat ni na voljo. V Nacionalnem forenzičnem laboratoriju (v nadaljevanju NFL) smo usmerili naše raziskave na tri področja: spremembo postopka izolacije RNK in DNK, preverjanje robustnosti, senzitivnosti in specifičnosti biomarkerjev mRNA na realnih vzorcih in testiranje izražanja označevalnih genov MMP7, MMP11 in MUC4 v vseh obdobjih menstrualnega cikla. S tem smo želeli vpeljati novo metodo v laboratorij, s katero bi lahko potrdili prisotnost vaginalnih izločkov in sline ter menstrualne krvi. To pred uvedbo omenjene metode, se pravi identifikacije telesnih tekočin s pomočjo informacijske RNK, ni bilo izvedljivo.

3.1 Sočasna izolacija RNK/DNA, robustnost, senzitivnost in specifičnost biomarkerjev RNK

Prednost pri določevanju izvora biološke sledi s pomočjo mRNK je v tem, da lahko sočasno izoliramo označevalec za izvor biološke sledi, v drugem delu postopka pa lahko določimo še profil DNK osumljenega.

Znano je, da so encimi, ki razgrajujejo RNK (ribonukleaze) prisotni povsod. Prav zaradi tega so mislili, da bo izolacija RNK iz forenzičnih vzorcev predstavljala težavo. Forenzični vzorci so namreč zavarovani kasneje in tako so dalj 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 et al., 2008). mRNK so lahko zaznali v vzorcih krvi in sline, 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 et al., 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.

Za preverjanje robustnosti, senzitivnosti in specifičnosti biomarkerjev RNK (GAPDH, MUC4, STATH in HTN3) smo pridobili penilne brise, odvzete s penisa po različnih spolnih odnosih (Hadžić, Lukan in Drobnič, 2011). Vse (8 vrst) penilne brise smo zbrali 5-krat od različnih prostovoljcev z njihovo polno privolitvijo. Brisi so bili odvzeti z obrezanih in neobrezanih penisov 1 uro po spolnem odnosu brez ejakulacije, in sicer pri heteroseksualnih kot tudi pri homoseksualnih parih. Za pozitivno kontrolo smo vzeli brise mandeljnov. Vaginalne vzorce za ugotavljanje izražanja MUC4 smo pridobili od 6 različnih žensk, v starosti od 25 do 50 let. Prav tako smo z neobrezanih penisov odvzeli brise smegme. Rezultate predstavljamo v tabeli 1.

²¹ Morfogeneza je biološki proces, ki povzroči nastanek in obliko organizma (Cooper, 2000).

Tabela 1: Seznam penilnih brisov, odvzetih po različnih spolnih odnosih

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

4 Rezultati

Gen GAPDH smo zaradi njegovih lastnosti uporabili kot interno oziroma pozitivno kontrolo pri testiranju vseh označevalcev. GAPDH se namreč konstantno in podobno izraža v različnih tkivih, ne glede na starost in spol. GAPDH smo zaznali v vseh vzorcih, v nekaterih primerih je bilo njegovo izražanje zelo visoko. Glede na to, da je v nekaterih tkivih njegovo izražanje povečano, kot so v našem primeru mandeljni, so rezultati potrdili pravilno izbiro tega gena, saj smo ga zaznali povsod (Barber, Harmer, Coleman in Clark, 2005).

Prisotnosti vaginalnih izločkov na penisu smo ugotavljali s pomočjo biomarkerja MUC4. Omenjeni biomarker MUC4 smo vedno (5/5) našli na neobrezanem penisu, pri vaginalnih spolnih odnosih, 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 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.

Specifičnost in zanesljivost mRNK označevalca MUC4 smo preverjali v vaginalnih vzorcih, odvzetim ženskam v različnih menstrualnih ciklih in starosti, ter v vzorcih sline. MUC4 smo zasledili v 32 od 42 vaginalnih vzorcev. Naše ugotovitve so podobne ugotovitvam Gipsona in sodelavcev (1997).

Ti so z Northern in *in situ* hibridizacijo potrdili MUC4 v 2 od 4 vaginalnih vzorcih. Izražanje MUC4 je namreč v korelaciji z menstrualnim ciklom in tudi nivojem estrogena in progesterona v krvi (Gipson et al., 1999). Zanimivo je to, da so bili vsi vzorci (9 vzorcev), odvzeti ženski v menopavzi, negativni za označevalca MUC4. 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 et al., 2010). Ugotovili smo, da MUC4 ni popolnoma specifičen, saj smo ga zaznali v treh od 52 vzorcev sline. Podobne rezultate lahko opazimo pri Cossu in sodelavcih (2009) ter Nussbaumerju in sodelavcih (2006), ki so uporabili drugačne začetne oligonukleotide in kar v petih od 15 vzorcev sline zaznali MUC4.

Prav tako smo testirali izražanja označevalnih genov MMP7 in MMP11 v vseh obdobjih menstrualnega cikla, saj so nekateri avtorji poročali o različnih genskih ekspresijah²² omenjenih genov (Cossu et al., 2009; Lewin, 2000;

²² Regulacija ekspresije (izražanja) genov (»genska regulacija«) je celična kontrola nastanka funkcionalnega produkta gena v zadostni količini in v točno določenem času. Funkcionalni produkt gena je lahko RNK ali pa protein. Znanih je mnogo mehanizmov, ki uravnavajo izražanje protein kodirajočih genov. Pri genskem izražanju je lahko kateri koli korak uravnavan: od DNK-RNK prepišovalnega koraka do post-translacijske spremembe proteina. Genska regulacija omogoči celici kontrolo nad strukturo in funkcijo in je osnova za celično diferenciacijo, morfogenezno, spremenljivost in prilagoditev pri katerem koli organizmu (Lewin, 2000).

Nussbaumer et al., 2006). Rezultati naših raziskav (rezultati niso prikazani) so podobni kot pri nekaterih drugih avtorjih, in sicer, da se MMP7 in MMP11 ne izražata enako med menstruacijo. Najverjetnejši razlog za to je, da je odstotek krvi v menstrualni tekočini relativno majhen in da je prisotnost krvi odvisna od (ne)uživanja kontracepcijskih tablet (Fraser, McCarron, Markham in Resta, 1985; Fraser, Warner in Marantos, 2001). Prav tako prihaja do največje izgube krvi v prvih dveh dneh menstruacije (Fraser et al., 2001). Ugotovili smo, kot nekateri drugi (Bauer in Patzelt, 2002; Haas et al., 2009; Roeder in Haas, 2012), da je prisotnost vsaj dveh markerjev (MMP7 in MMP11) zelo dober pokazatelj prisotnosti menstrualne krvi, vendar nista dokončna pokazatelja.

Poleg vsega nas je zanimala tudi prisotnost označevalcev za slino (STATH in HTN3) na penisu pri oralnem spolnem odnosu. Ugotovili smo, da sta omenjena označevalca zelo dobra pokazatelja, da je pri seksualnem deliktu prišlo do oralnega spolnega odnosa, saj smo v vseh primerih na penisu našli omenjena označevalca. Prav tako nismo dobili nobenih lažno pozitivnih rezultatov.

V tabeli 2 so predstavljeni označevalci, ki se trenutno uporabljajo v Nacionalnem forenzičnem laboratoriju za ugotavljanje izvora biološke sledi.

specifičnosti in možnosti sočasnega izvajanja obeh osnovnih forenzičnih preiskav, identifikaciji izvora (tkivo) in donorja (posameznik) biološke sledi. Čeprav prisotnost biomarkerjev informacijske RNK v vzorcu ni dokončen potrditveni test, je njihova ugotovitev zelo dober pokazatelj izvora biološke sledi, medtem ko njihova nepotrditve oz. negativni rezultati ne pomenijo, da biološka sled ne izhaja iz iskane telesne tekočine/tkiva. Predvsem pri ugotavljanju vaginalnih izločkov in menstrualne krvi je namreč izražanje teh genov močno pogojeno s fiziološkimi spremembami. Tako smo v Nacionalnem forenzičnem laboratoriju uvedli metodo za ugotavljanje izvora biološke sledi, ki je pred to raziskavo nismo izvajali. Pri tem uporabljamo več označevalcev in preverjamo njihovo intenziteto izražanja, saj lahko pri uporabi le enega biomarkerja mRNK ali brez upoštevanja intenzitete izražanja dobimo lažne pozitivne rezultate. Trenutni biomarkerji za identifikacijo vaginalnih izločkov ali menstrualne krvi se namreč šibko izražajo tudi v drugih telesnih celicah in posledično v izločkih. Zato pri identifikaciji bioloških sledi s pomočjo mRNK v NFL uporabljamo kombinacijo različnih biomarkerjev mRNK. Tako lahko v nekaterih primerih, kjer imamo pozitivne rezultate iskanih označevalcev in visoke RFU, skoraj z gotovostjo govorimo o izvoru biološke sledi. Po vpeljavi nove metode smo na Oddelku za biološke preiskave začeli ugotavljati izvor bioloških sledi predvsem pri spolnih nasiljih. Pri posilstvih, kjer

Tabela 2: Označevalci, ki se uporabljajo v NFL za ugotavljanje izvora biološke sledi

BIOLOŠKA SLED	BIOMARKER INFORMACIJSKE MRNK	LITERATURA
Slina	Histatin 3 (HTN3) Statherin (STATH)	Juusola in Ballantyne, 2005 Haas et al., 2009
Vaginalni izločki	Mucin 4 (MUC4) <i>Lactobacillus crispatus</i> (LCRIS) <i>Lactobacillus gasseri</i> (LGAS) <i>Lactobacillus jensenii</i> (LJEN) Miozin 1 (MYOZ 1) CYP2B7P1 Humani β -defenzin 1 (HBD1)	Haas et al., 2009 Fleming in Harbison, 2010b Fleming in Harbison, 2010b Roeder in Haas, 2012 Hansona in Ballantyne, 2013 Hansona in Ballantyne, 2013 Roeder in Haas, 2012
Menstrualna kri	Matriksne metaloproteinaze 7, 10 in 11 (MMP7, MMP10 in MMP11)	Bauer in Patzelt, 2002 Juusola in Ballantyne, 2005 Haas et al., 2009

5 Zaključek

Konvencionalne identifikacijske metode in profiliranje STR bioloških sledi so vsakodnevna praksa v forenzičnem preiskovanju. V NFL smo na podlagi svojih raziskav ugotovili, da uporaba biomarkerjev mRNK da nove informacije o dokaznem materialu in prispeva k razjasnitvi okoliščin kaznivega dejanja. Menimo, da je prednost biomarkerjev mRNK pred konvencionalnimi metodami tudi v relativno visoki tkivni

je bil policiji osumljeni znan, smo samo z analizo njegovih spodnjih hlač ugotovili, da sta oškodovana in osumljeni imela spolne odnose. Prav tako smo lahko pri nekaterih kaznivih dejanjih iz brisa bioloških sledi, odvzetega s prstov osumljenege, ugotovili, da je le z njimi prodiral v nožnico oškodovanke. V nekaterih primerih smo lahko dokazali, da ni bilo krvavitve iz nožnice zaradi penetracije, temveč zaradi menstruacije.

Literatura

1. Akutsu, T., Watanabe, K., Fujinami, Y. in Sakurada, K. (2010). Applicability of ELISA detection of statherin for forensic identification of saliva. *International Journal of Legal Medicine*, 124(5), 493–498.
2. Allery, J. P., Telmon, N., Miesusset, R., Blanc, A. in Rouge, D. (2001). Cytological detection of spermatozoa: Comparison of three staining methods. *Journal of Forensic Science*, 46(2), 349–351.
3. Alvarez, M., Juusola, J. in Ballantyne, J. (2004). An mRNA co-isolation method for forensic casework samples. *Analytical Biochemistry*, 335(2), 289–298.
4. Azen, E. A., Leutenegger, W. in Peters, E. H. (1978). Evolutionary and dietary aspects of salivary basic (Pb) and post Pb (PPb) proteins in anthropoid primates. *Nature*, 273(5665), 775–778.
5. Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology*, 8(9), 227.
6. Balk, S. P., Ko, Y. J. in Bubley, G. J. (2003). Biology of prostate-specific antigen. *Journal of Clinical Oncology*, 21(2), 383–391.
7. Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A. in 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.
8. Bauer, M. in Patzelt, D. (2002). Evaluation of mRNA markers for the identification of menstrual blood. *Journal of Forensic Science*, 47(6), 1278–1282.
9. Bauer, M. in Patzelt, D. (2003). Protamine mRNA as molecular marker for spermatozoa in semen stains. *International Journal of Legal Medicine*, 117(3), 175–179.
10. Boskey, E. R., Telsch, K. M., Whaley, K. J., Moench, T. R. in 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.
11. 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.
12. Brogden, K. A. in Guthmiller, J. M. (2002). *Polymicrobial diseases*. Washington: ASM Press.
13. Cooper, G. M. (2000). *The cell: A molecular approach* (2nd ed.). Sunderland: Sinauer Associates.
14. Cossu, C., Germann, U., Kratzer, A., Bär, W. in Haas, C. (2009). How specific are the vaginal secretion mRNA-markers HBD1 and MUC4. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2(1), 536–537.
15. Drobnič, K. (2004). Biološke sledi. V D. Maver (ur.), *Kriminalistika: uvod, taktika, tehnika* (str. 413–460). Ljubljana: Uradni list Republike Slovenije.
16. Ellegren, H. (2000). Microsatellite mutations in the germline: Implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics*, 16(12), 551–558.
17. Fang, R., Manohar, C. F., Shulse, C., Brevnov, M., Wong, A., Petruskensk, O. V. et al. (2006). Real-time PCR assays for the detection of tissue and body fluid specific mRNAs. *International Congress Series*, 1288, 685–687.
18. Fleming, R. I. in 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.
19. Fleming, R. I. in Harbison, S. (2010b). The use of bacteria for the identification of vaginal secretions. *Forensic Science International. Genetic*, 4(5), 311–315.
20. Fraser, I. S., Warner, P. in Marantos, P. A. (2001). Estimating menstrual blood loss in women with normal and excessive menstrual fluid volume. *Obstetrics and Gynecology*, 98(5), 806–814.
21. Fraser, I. S., McCarron, G., Markham, R. in Resta, T. (1985). Blood and total fluid content of menstrual discharge. *Obstetrics and Gynecology*, 65(2), 194–198.
22. Gipson, I. K., Ho, S. B., Spurr-Michaud, S. J., Tisdale, A. S., Zhan, Q., Torlakovic, E. et al. (1997). Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biology of Reproduction*, 56(4), 999–1011.
23. Gipson, I. K., Spurr-Michaud, S., Moccia, R., Zhan, Q., Toribara, N., Ho, S. B. et al. (1999). MUC 4 and MUC5 transcripts are prevalent mucin messenger ribonucleic acid of the human endocervix. *Biology of Reproduction*, 60(1), 58–64.
24. Grant, F. J., Taylor, D. A., Sheppard, P. O., Mathewes, S. L., Lint, W., Vanaja, E. et al. (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.
25. Haas, C., Klessner, B., Maake, C., Bär, W. in 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.
26. Haas, C., Hanson, E., Anjos, M. J., Ballantyne, K. N., Banemann, R., Bhoelai, B. et al. (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.
27. Hadžić, G., Lukan, A. in 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.
28. Hansona, E. K. in 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.
29. 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.
30. Hay, D. I. in Schlesinger, D. H. (1977). Human salivary statherin: A peptide inhibitor of calcium phosphate precipitation. V R. H. Wassermann (Ed.), *Calcium binding proteins and calcium function* (str. 401–408). New York: Elsevier.
31. Hay, D. I., Smith, D. J., Schluckebier, S. K. in 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.
32. Hedman, J., Dalin, E., Rasmussen, B. in 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.
33. Heller, C. G. in Clermont, Y. (1963). Spermatogenesis in man: An estimate of its duration. *Science*, 140(3563), 184–186.
34. Hermon, D., Shpitzen, M., Oz, C., Glattstein, B., Azoury, M. in 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.
35. Herzog Velikonja, B. in Gruden, K. (2000). *Praktikum iz molekularne biologije – teoretični del*. Ljubljana: ŠOU – Študentska založba.

36. Huang, A. J., Moore, E. E., Boyko, E. J., Scholes, D., Lin, F., Vittinghoff, E. et al. (2010). Vaginal symptoms in postmenopausal women: Self-reported severity, natural history, and risk factors. *Menopause*, 17(1), 121–126.
37. Juusola, J. in Ballantyne, J. (2003). Messenger RNA profiling: A prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. *Forensic Science International*, 135(2), 85–96.
38. Juusola, J. in Ballantyne, J. (2005). Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. *Forensic Science International*, 152(1), 1–12.
39. Kornberg, R. D. in Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, 98(3), 285–294.
40. Laffan, A., Sawyer, I., Quinones, I. in Daniel, B. (2011). Evaluation of semen presumptive tests for use at crime scenes. *Medicine, Science, and the Law*, 51(1), 11–17.
41. Lewin, B. (2000). *Genes VII*. New York: Oxford University Press.
42. Liu, B., Lague, J. R., Nunes, D. P., Toselli, P., Oppenheim, F. G., Soares, R. V. et al. (2002). Expression of membrane-associated mucins MUC1 and MUC4 in major human salivary glands. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50(6), 811–820.
43. Lundwall, A., Bjartell, A., Olsson, A. Y. in 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.
44. Nelson, D. L. in Cox, M. M. (2004). *Lehninger principles of biochemistry* (4th ed.). San Francisco: W. H. Freeman.
45. Nussbaumer, C., Gharehbaghi-Schnell, E. in Korschinek, I. (2006). Messenger RNA profiling: A novel method for body fluid identification by real-time PCR. *Forensic Science International*, 157(2–3), 181–186.
46. Oppenheim, F. G., Xu, T., McMillian, F. M., Levitz, S. M., Diamond, R. D., Offner, G. D. et al. (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.
47. Park, N. J., Li, Y., Yu, T., Brinkman, B. M. N. in Wong, D. T. (2006). Characterization of RNA in saliva. *Clinical Chemistry*, 52(6), 988–994.
48. Poon, H., Elliott, J., Modler, J. in Fréreau C. (2009). The use of hemastix® and the subsequent lack of DNA recovery using the promega DNA IQTM system. *Journal of the Forensic Sciences*, 54(6), 1278–1286.
49. Raj, P. A., Johnsson, M., Levine, M. J. in 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.
50. Roeder, A. D. in 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.
51. Sackmann, E. (1995). *Biological membranes architecture and function: Handbook of biological physics* (1st ed.). München: Elsevier Science.
52. Sakurada, K., Ikegaya, H., Fukushima, H., Akutsu, T., Watanabe, K. in Yoshino, M. (2009). Evaluation of mRNA-based approach for identification of saliva and semen. *Legal Medicine*, 211(3), 125–128.
53. Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109(6), 365–371.
54. Setzer, M., Juusola, J. in 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.
55. Steger, K., Pauls, K., Klonisch, T., Franke, F. E. in Bergmann, M. (2000). Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Molecular Human Reproduction*, 6(3), 219–225.
56. Stušek, P. (2003). *Biologija človeka* (1. izd.). Ljubljana: DZS.
57. 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.
58. Van der Spek, J. C., Wyandt, H. E., Skare, J. C., Milunsky, A., Oppenheim, F. G. in 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.
59. Virkler, K. in 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.
60. Vozelj, M. (2000). *Temelji imunologije*. Ljubljana: DZS.
61. Woessner, J. F. in Nagase, H. (2000). *Matrix metalloproteinases and timp*s. Oxford: Oxford University Press.
62. Zubakov, D., Hanekamp, E., Kokshoorn, M., van Ijcken, W. in 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.

Identification of the Human Body Fluids Using Messenger RNA Biomarkers

Gavrilo Hadžić, BSc. in Microbiol., Forensic expert, National Forensic Laboratory, General Police Directorate, Ministry of the Interior, Slovenia. E-mail: gavrilo.hadzic@policija.si

Katja Drobnič, Ph.D., Professor of Forensic Science, Faculty of Criminal Justice and Security University of Maribor, and Head of biology department, National Forensic Laboratory, General Police Directorate, Ministry of the Interior, Slovenia. E-mail: katja.drobnic@policija.si

Identifying human body fluids using a messenger RNA (mRNA) is important for forensic work, as well as for the further criminal investigation, because it allows “insight” into criminal events. Conventional body fluids identification methods, such as chemical and morphological tests, are still being used in most routine forensic investigations; however, these tests have certain limitations. They are not specific, and with these tests the specific body secretions, such as vaginal secretions, cannot be determined and we cannot distinguish between menstrual and venous/arterial blood. On the contrary, a molecular approach with mRNA allows a simultaneous identification of several different biological fluids. An additional advantage is that the mRNA and DNA can simultaneously be isolated, and a number of mRNA markers, that are specific for a particular body fluid, have been identified. Recent studies have shown that it is possible to effectively isolate the mRNA also from older forensic samples. In this article, the authors present a general overview of the field of forensics and the latest mRNA biomarkers. Furthermore, results from the National Forensic Laboratory and their usefulness for solving criminal cases, especially in the area of sexual violence, are presented.

Keywords: body fluids identification, mRNA, vaginal secretions, MUC4, Statherin, Histatin 3, menstrual blood, MMP7, Lactobacillus

UDC: 343.983.2