



Adli DNA Analizlerinde Güncel Moleküler Genetik Gelişmeler

Current Molecular Genetic Developments in Forensic DNA Analysis

Esra Tekcan, Şengül Tural

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, Samsun, Türkiye

Özet

Adli biyolojik delillerden elde edilen DNA analizi olayla ilişkili failin belirlenmesinde güçlü kanıtlar sağlamaktadır. Kısa ardışık tekrar bölgelerindeki (STR) tekrar sayısının kişiler arası farklılık göstermesi ve bu bölgelerdeki mutasyon oranının az olması donörün kimliklendirilmesinde STR'leri genetik markır olarak tercih edilir hale getirmiştir. Fakat adli biyolojik materyaldeki DNA miktarının çok düşük olması ya da DNA'nın analize izin vermeyecek derecede bozulması, adli genetik yöntemlerde sıklıkla kullanılan kısa ardışık tekrar bölgelerinin belirlenememesine neden olabilir. Şüpheli bir durumda, STR profili ile bir eşleşme olmadığında, numunenin donörünün belirlenmesine yardımcı olabilecek herhangi bir bilgi çok değerli olacaktır. Bu nedenle adli genetikte, analizi güç olan biyolojik örneklerin ait olduğu kimliğin teşhis edilmesinde, adli DNA fenotipleme ile donörün yaşı, saç ve göz rengi gibi fiziksel görünümü hakkında ek bilgilerin çıkarılmasında, ayrıca vücut sıvısı ve doku tipi tayini için mRNA ve miRNA analizlerini içeren, genetik ve epigenetik alanda yeni güncel moleküler metodlar gelişmeye başlamıştır. Bu derlemede, STR'lerin ve diğer markırların analizine büyük ölçüde masif paralel dizilemenin (massively parallel sequencing, MPS) uygulanması, birden fazla kişiye ait genetik materyal içeren karışım DNA profillerinin yorumlanmasındaki gelişmeler, vücut sıvılarının tanımlanması için RNA profillerinin belirlenmesi ve metilasyon profillerinin incelenmesi gibi epigenetik yöntemlerin de dahil edilmesiyle ilgili fenotipin belirlenmesinde, analiz potansiyelinin en üst seviyeye çıkarılması için bu alandaki son gelişmeler gözden geçirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Adli genetik; DNA; moleküler genetik.

Abstract

DNA analysis obtained from forensic biological evidence provides strong evidence in identifying the perpetrator associated with the incident. The interindividual difference in the number of repeats in short tandem repeat (STR) regions and the low mutation rate in these regions have made STRs preferred as genetic markers for donor identification. However, if the amount of DNA in the forensic biological material is too low or the DNA is corrupted to such an extent that it does not allow analysis, the short tandem repeat regions, which are frequently used in forensic genetic methods, cannot be determined. In the case of doubt, when there is no match to the STR profile, any information that can assist in identifying the sample's donor would be invaluable. Therefore, in the forensic genetics, in the diagnosis of the identity of biological samples that are difficult to analyze, determining the additional information about the physical appearance of the donor such as age, hair and eyes colours with forensic DNA phenotyping, also such as body fluid and tissue type determination with mRNA and miRNA analyses, new current molecular methods have started to develop in the genetic and epigenetic field. In this review, for analysis of STRs and other markers we review recent advances in this field to maximize the analysis potential in identifying the phenotype of interest, largely through the application of massive parallel sequencing (MPS), developments in the interpretation of mixture DNA profiles containing genetic material of more than one person, RNA profiling for body fluid identification, and inclusion of epigenetic methods such as examination of methylation profiles.

Keywords: Forensic genetics; DNA; molecular genetics.

Giriş

Yaklaşık otuz beş yıl önce biyolojik delillerden DNA analizinin bir ceza davasında ilk kez kullanılması adli tıp araştırmalarında devrim niteliği taşımaktadır (1). Tarihçesine baktığımızda adli genetik analizler ilk olarak, yüksek moleküler ağırlıklı DNA'nın restriksiyon parça uzunluk polimorfizmlerine (RFLP'ler) dayanan protein temelli tekniklerden geliştirilmiştir. Daha sonra polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile genetik

tanımlamada altın standart haline gelen kısa tandem tekrar (short tandem repeat, STR) dizilerinin amplifikasyonu RFLP analizinin yerine geçmiştir (2). STR tiplene kitlerine dahil edilen lokuslardaki artışla DNA veri tabanlarında şüpheli ile eşleşen STR profilleri soruşturma için güçlü kanıtlar sağlamaktadır. Fakat profil eşleşmediğinde, biyolojik delildeki DNA miktarı yetersiz olduğunda yada DNA analiz edilemeyecek derecede bozulduğunda, STR profillemesi sınırlı hale gelebilir (1). Ceza adaleti sisteminde her ne

kadar yeni teknik ve teknolojinin uygulamaya girmesi yavaş olsa da, analizi güç biyolojik örneklerin değerlendirilmesinde yeni metodolojiler geliştirilmekte ve son yıllarda adli genomik alanda hızlı genişlemeler görülmektedir.

Masif Paralel Dizileme (MPS)

Genel Sanger dizileme ve erken pyro dizileme yöntemlerinden sonra geliştirilen, yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri olarak adlandırılan MPS teknolojileri, bir seferde milyonlarca dizi okuma yetenekleriyle biyolojik bilimlerde çığır açmıştır (3). MSP tüm genomun yüksek verimlilikte dizilenmesini sağlamış olsa da adli uygulamalar daha hedefe yöneliktir ve ampikonların MPS'sinden önce bir dizi hedef işaretçinin ilk PCR amplifikasyonunu içerir (4). Illumina sentez yoluyla dizileme ve ThermoFisher'in yarı iletken tabanlı IonTorrent dizileme yöntemi olarak MPS'nin adli uygulamalar için kullanılan iki ana teknoloji platformu bulunmaktadır (5). Bu yöntemlerde kullanılacak ilgili belirteçleri hedefleyen adli kullanım için doğrulanmış kitler mevcuttur. Bir seferde çok sayıda farklı belirteç tipini hedefleme yeteneği, MPS yöntemlerinin temel avantajlarından biridir, bu şekilde ayırım gücünü artırır ve adli örneklerde genellikle sınırlı olan DNA'nın analizine imkan verir (6). STR bölgelerindeki varyantlar dahil, hedeflenen işaretleyicilerdeki nükleotit dizisi varyasyonunu belirlemesi MPS'nin önemli bir üstünlüğüdür. Bu, kapiler elektroforez uzunluğuna dayalı tipleme kullanılarak ayırt edilemeyecek alellerin ayırt edilmesine izin verir ve bu karışık profillerin yorumlanması için avantaj sağlar (7). Ayrıca, STR profillemeye ile karşılaştırıldığında daha kısa ampikonların bir neticesi olarak, az miktardaki ve bozulmuş DNA örnekleri için sonuç almamızı sağlar (1). Vaka çalışmalarında henüz yaygın olarak uygulanmamış olsa da, RNA dizilimi, epigenetik, adli DNA fenotiplemesi gibi adli analizin diğer alanlarında daha geniş uygulamalarla bu teknolojilerin adli tıp topluluğu için vazgeçilmez araçlar haline gelmesi olasıdır.

DNA Karışımlarını Yorumlama

Birden fazla kişiye ait olan karışım DNA profillerinin yorumlanması, sadece profilde bulunan potansiyel alel sayısı nedeniyle değil, aynı zamanda bu tür profillerin genellikle alel bırakma/kaybetme ve heterozigot dengesizlik gibi karmaşık özelliklerle düşük seviyeli olması nedeniyle tek kaynaklı profillerden çok daha karmaşıktır (1). Alınan numuneler genelde kompleks numunelerdir ve çok sayıda kişiye ait

örnek içerir. Karışık profillerin bu artan karmaşıklığı, giderek daha karmaşık "karışım yorumlama" yöntemlerini gerektirmiştir. Bir bireyin bir karışıma potansiyel katkı yapan kişi olarak hariç tutulup tutulamayacağı, bir karışıma katkıda bulunanların en olası genotip kombinasyonlarını tahmin eden olasılık oranı yöntemlerinin kullanımına kadar değişen nispeten basit yöntemlerden uzaklaşmıştır. Bu, doğrulama ve ampirik verilerden modellenen, alel kaybetme ve kazanma olasılıklarını içeren, olasılık çerçevelerini kullanan "karışım yorumlama" yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır (8). Olasılıksal genotipleme yöntemlerini uygulayan yazılım paketleri oldukça karmaşıktır. Bazıları kullanıcı tarafından verilen subjektif kararlardan, bazıları da yöntemlerin doğasında bulunan değişkenlikten dolayı, olasılıksal genotipleme yöntemlerinin sonucundaki varyasyon hakkında endişeleri dile getirilmiştir. Bazı ülkeler, olasılıksal genotipleme yöntemlerinin mahkemede kabul edilebilirliği ve yöntemlerin toplumda genel kabul görüp görmediği konusunda kapsamlı tartışmalar gerçekleştirdiler, ancak bu yöntemlerin dünya çapındaki adli laboratuvarlarda yaygın olarak uygulanması, bunların kabul olduğunu gösteriyor (9). Bu yöntemler aynı zamanda, uzunluğa göre ayırt edilemeyen aleller arasındaki dizi farklılıklarının tanımlanmasında daha fazla karmaşıklığı ortaya çıkarabilen MPS verilerinin yorumlanması için de önemli vaatler sağlamaktadır.

Vücut Sıvılarının Tanımlanması

Spesifik bir vücut sıvısının varlığının belirlenmesi, özellikle bir DNA profilinin belirli bir biyolojik kaynağa bağlanabileceği anlamına geliyorsa, bir olayla ilgili faaliyetler hakkında çok önemli bilgiler sağlayarak bir araştırma için son derece değerli olabilir. Şu anda tanımlamak için kullanılan tüm varsayımsal/doğrulayıcı testler bazı (ancak tümü değil, örneğin vajinal materyal, menstrüel kan) vücut sıvılarının, duyarlılık ve özgüllük eksikliği gibi bazı sınırlamaları vardır (10). Bu durum, vücut sıvısı lekelerinde RNA analizine ilgi duymaya yol açmıştır, özellikle verilen RNA, DNA ile birlikte ekstrakte edilebilir ve vücut sıvısı testinin yanı sıra bir DNA profilinin paralel üretimine izin verir (11). RNA profili kullanılarak vücut sıvılarının tanımlanması, çoğu hücre tipinde DNA içeriğinin aynı olmasına rağmen, RNA'nın hücre tipine ve işlevine bağlı olarak farklılık gösterdiği ilkesine dayanır. RNA üretimi bu nedenle dokuya özgüdür, öyle ki her vücut sıvısı belirli bir gen ekspresyon modeline sahiptir. Bir numunede dokuya özgü

RNA türlerinin varlığı bu nedenle belirli vücut sıvılarının varlığını gösterebilir (12). Bu alandaki araştırmalar, farklı şekilde ifade edilen RNA'lar için büyük ölçekli ekranlara ve ardından bireysel veya az sayıda belirteci hedef alan PCR tabanlı incelemelerin geliştirilmesine odaklanmıştır. Bu tahlillerin çoğu, uyumluluk avantajına sahip olan ters transkripsiyon uç noktası (RT-PCR) veya kantitatif gerçek zamanlı (RT-qPCR) PCR kullanır (13). Adli laboratuvarlardaki mevcut teknolojilerle birlikte, giderek artan çalışmalar dokuya özgü RNA'ların tanımlanması ve analizi için MPS'nin gücünü kullanıyor. İlk testler, vücut sıvısına özgü haberci RNA (mRNA) işaretçilerini tanımlamaya ve ikincisi özellikle vücut sıvısı olan tek veya çoklu vücut sıvısı türlerinin varlığını gösteren multiplekslerin geliştirilmesine odaklanmıştır (1). Bu uygulamalar karışık numuneleri analiz ederken faydalıdır. Bununla birlikte, mRNA'ların bozunmaya karşı duyarlılığı, bunların adli örneklerle uygulanmasını sınırlamıştır ve mRNA analizleri ayrıca duyarlılık ve özgüllükteki varyasyonlar ve yorumlama zorlukları dahil olmak üzere sınırlamalardan muzdariptir (14). Daha yakın zamanlarda, vücut sıvısı tanımlaması için alternatif belirteçler olarak mikro RNA'lara (miRNA'lar) odaklanılmıştır (15). Bozunma veya susturma için mRNA'ları hedefleyen bu düzenleyici RNA'ların çoğu, aynı zamanda dokuya özgü ekspresyon gösterirler ve daha küçük boyutları ve bir hücreye dahil edilmelerinin bir sonucu olarak mRNA'ya kıyasla artan stabilite avantajına sahiptirler. MiRNA tabanlı testler, özellikle yorumlama açısından mRNA tabanlı testler ile aynı zorluklardan muzdarip olsa da, miRNA'lar vücut sıvısı belirteçleri olarak büyük potansiyele sahiptir (16-17). Farklı vücut sıvılarını açık bir şekilde tanımlamak için en iyi miRNA setlerini belirlemek için daha fazla çalışma ve elde edilen testlerin ayrıntılı doğrulaması, adli tıp camiasına vücut sıvılarının tanımlanması için güvenilir bir test verebilir (15). Mikro RNA belirteçleri, vücut sıvısı lekelerinin çökeltme süresinin ve ölüm sonrası aralığın tahmin edilmesi de dahil olmak üzere diğer adli uygulamalar için de umut vaat etmektedir (18).

Adli DNA Fenotiplemesi

Şüpheli bir durumda, STR profili ile bir eşleşme olmadığında, numunenin donörünün belirlenmesine yardımcı olabilecek herhangi bir bilgi çok değerli olacaktır. Bu durum, DNA'dan, dışarıdan görülebilen özellikleri (externally visible characteristics: EVC'ler) tahmin eden testlerin geliştirilmesine yol açmıştır. Elde edilen veriler, istihbarat sağlayabilir ve soruşturmalara yol açarak

potansiyel şüpheli havuzunu daraltır (19). Bireyin görünüşünü tahmin etme yeteneği, kayıp şahıs vakalarında ve afet kurbanlarının belirlenmesinde de faydalıdır. Daha yaygın olarak, adli DNA fenotiplemesinin (FDP: Forensic DNA Phenotype), EVC'lerin tahminini, biyo-coğrafi ataların çıkarımını ve epigenetik belirteçler kullanılarak yaş tahminini kapsadığı kabul edilir (20). FDP teknikleri, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları yoluyla belirli özelliklerle istatistiksel olarak ilişkili SNP'leri tanımlayan onlarca yıllık araştırmalardan geliştirilmiştir (21). Bu verilerle, PCR multiplekslerinde yazılabilen ve ilgilenilen EVC'leri yüksek doğrulukla tahmin eden istatistiksel modeller kullanılarak analiz edilebilen küçük SNP setleri tanımlanmıştır. Bunların en gelişmiş ve başarılı olanı, insan pigmentasyon özelliklerinin tahmini ile ilgilidir. İnsan pigmentasyon özelliklerinin tahmini için bir dizi test sistemi geliştirilmiştir. Adli olarak doğrulanmış IrisPlex, HIrisPlex ve HirisPlex-S testleri, sırasıyla 6, 24 ve 41 SNP'yi analiz ederek göz, saç ve ten rengi tahmininde kullanılmaktadır (1). Genomiks Konsorsiyumu aracılığıyla görülebilir nitelikler olan VISAGE, araştırmalar sırasında elde edilen DNA'dan bir bireyin görünümü, yaşı ve ataları hakkında istihbarat bilgilerinin sağlanmasına yönelik olarak çalışmak üzere 2017 yılında kurulmuş, AB tarafından finanse edilen ortak bir araştırma programıdır (<http://www.visage-h2020.eu>). Konsorsiyum ayrıca, birçok ülkede şu anda herhangi bir özel mevzuata tabi olmayan, adli amaçlı DNA'dan EVC'lerin tahminini çevreleyen karmaşık yasal, düzenleyici ve etik konulara da odaklanmaktadır (22). VISAGE araştırmacıları ve diğerleri, kaş rengi, boy, çiller ve bronzlaşma gibi cilt özellikleri ve diğer saçla ilgili fenotipler, saç şekli ve yaşa bağlı saç koyulaşması gibi dahil olmak üzere diğer EVC'leri tahmin etmek için sistemlerin geliştirilmesinde ilerleme kaydetmeye devam ediyor (23).

Epigenetik ve DNA Metilasyon Analizleri

Genomdaki DNA bazlarının dizisi içinde kodlanan bilgilere ek olarak, DNA molekülü, nükleotidlerin ve kromatin ile ilgili proteinlerin kimyasal modifikasyonları biçiminde ek bir bilgi katmanı taşır (24). Geniş anlamda epigenetik değişiklikler olarak tanımlanan bu modifikasyonlar, gen ekspresyon modellerini değiştirir. Çeşitli mekanizmalar yoluyla ve kanser gibi hastalıklarla ilişkili epigenetik hatalarla birlikte temel hücresel süreçlerin düzenlenmesinde bir rolü olduğu gösterilmiştir (25). İnsan genomundaki sitozin kalıntılarının 5' pozisyonuna bir metil grubunun (-

CH3) eklenmesi, özellikle sitozin-guanin dinükleotidlerinde (CpG bölgeleri olarak bilinir) bulunanlar, en çok çalışılan epigenetik modifikasyonlardan biridir ve gözlemler yaşa ve doku tiplerine göre farklı metilasyon paternleri, DNA metilasyon analizinin adli uygulamalarına ilgi duymaya yol açmıştır (26). DNA metilasyon analizi, monozigotik ikizlerin ayrımı ve sigara içme durumunun belirlenmesi dahil olmak üzere bir dizi başka adli uygulamaya sahip olsa da, bu alandaki araştırmalar bir DNA numunesi donörünün yaşının tahmin edilmesine ve vücut sıvıları ve diğer adli olarak ilgili biyolojik numuneler için doku tipinin belirlenmesine odaklanmıştır (27-28). DNA metilasyonu hücre farklılaşmasında çok önemli bir rol oynar, öyle ki CpG bölgeleri farklı dokularda farklı şekilde metillenir (25). Bu dokuya özgüllük, bir dizi teknoloji kullanılarak metilasyona dayalı tahlillerin geliştirilmesi için başarıyla kullanılmıştır (29). Çok sayıda çalışma, kan, meni, tükürük, vajinal materyal ve menstrüel kan dahil olmak üzere adli olarak ilgili doku tiplerinin tanımlanması için epigenetik belirteçler tanımlamıştır, bunlardan bazıları diğerlerinden daha önemli zorluklar ortaya çıkarmaktadır (29). RNA yerine DNA analizinden doku tipini tanımlamanın önemli bir faydası, her iki bilgi tipinin de aynı molekülden geldiği göz önüne alındığında, bunun bir STR profili ile karşılık gelen doku tipi arasında bir bağlantı sağlayabilmesidir (2). Bir DNA örneğinden bilinmeyen bir bireyin kronolojik yaşını tahmin etme yeteneği, özellikle çoğu yaşa göre değişebilen EVC'lerin tahmini ile birlikte araştırmacılara son derece yararlı istihbarat sağlayabilir (30). Bazı yazarlar, metilasyon seviyesinin korele olduğu CpG bölgelerini belirlemiştir. Pyrosequencing, SNaPshot kimyasını kullanan tek tabanlı uzatma ve EpiTyper (örn. Evrensel yaşa bağlı belirteçlerin, çoklu dokularda yaş tahmin etmek için modeller geliştirme açısından önemli faydaları olacaktır, ancak en yüksek yaş tahmin doğruluğu dokuya özgü modellerde görülmüştür (29,31). Bunlar, tükürük ve meni gibi diğer dokular üzerinde bazı çalışmalarla esas olarak tam kana odaklanmıştır (32) Şimdi, önceki teknolojilerin çoğullama sınırlamalarının üstesinden gelen ve tek bir yüksek hassasiyetli tahlilde çoklu CpG bölgelerinin analizine izin veren, yaş tahmini için bir dizi MPS tabanlı hedefli metilasyon analizi de geliştirilmiştir (33).

Genetik Soyağacı

Adli DNA veritabanlarının ailesel araştırması, STR profillerinde alel paylaşımının tespiti yoluyla şüphelilerin yakın (birinci/ikinci derece)

akrabalarını belirlemek için etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Soybilimciler genomdaki ortak ataya işaret eden daha uzak akrabalar (üçüncü ila dokuzuncu derece) ile aynı olan DNA uzantılarını saptayarak çok daha fazla sayıda DNA tespit edebilirler (34). Bu araştırmalar, doğrudan toplanan devasa genetik veri kümelerinden yararlanılarak elde edilir. Bu testler yüzbinlerce otozomal SNP varyantı oluşturur ve sonuçları daha sonra GEDmatch (<https://www.gedmatch.com/>) gibi büyük kamu platformlarında paylaşılır ve bu da test verenlerin potansiyel akrabaları tanımlamasına olanak tanır (35). Suç soruşturmasında ele geçirilen örneklerden oluşturulan profilleri kullanarak bu çevrimiçi platformların taranması, potansiyel failin akrabalarını belirleyebilir ve daha fazla soy araştırması, daha sonra DNA'sı bulunabilecek ve suç örnekleriyle karşılaştırılabilecek bir şüphelinin tanımlanmasına yol açabilir (36). Bu yaklaşım, kamuya açık veri tabanlarında yapılan aramalar, veri gizliliği ve etik konusunda endişelere yol açmıştır, ancak yetkililerin erişebildiği platformların çoğu artık tüketicilere istemedikleri takdirde vazgeçme seçeneği sunmaktadır (36). Genetik verilerin paylaşılması ve mahremiyeti ve bu tür aramaların yasallığı konusunda süregelen endişeler doğurmaktadır (34) Adli kullanım için soyağacı tekniklerine ilişkin doğrulama çalışmaları da yoktur ancak teknikler yalnızca araştırmalarda, genellikle uzun yıllar boyunca istihbarat ipuçlarını oluşturmak için kullanılır ve her zaman standart STR profili kullanılarak doğrulanır (35-36). GEDmatch'in adli genomik şirketi Verogen (<https://verogen.com/gedmatch-partners-with-genomics-firm/>) tarafından yakın zamanda satın alınmasıyla birlikte, özellikle soyağacı uygulamaları için tasarlanmış bir kitin piyasaya sürülmesiyle (<https://verogen.com/products/foren-seq-intelli-gence-kit/>) bu yöntemlerin soruşturmalarda yaygınlaşması muhtemel görünüyor.

Sonuç

Bu derleme, hızla genişleyen adli genetik alanındaki son önemli gelişmelerden bazılarını vurgulamaktadır, ancak burada ele alınamayan heyecan verici birçok araştırma alanı daha vardır. Örneğin, DNA ekstraksiyonundaki metodolojik gelişmeler (37), doğrudan PCR ve numunelerin taşınabilir cihazlarda hızlı/olay yerinde işlenmesi (38), MPS teknolojilerinin mikrohplotipler gibi yeni marker tiplerine uygulanması (39), insan ve çevresel mikrobiyomlarda insan dışı DNA analizi ve adli DNA analizinde üçüncü nesil dizileme cihazlarının kullanımı (5) bu alandaki mevcut ve

gelecekteki gelişmelerden sadece birkaçını temsil etmektedir.

Çıkar Çatışması: Yazarların bu çalışma ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek: Bu derleme için herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

Yazar Katkıları: Konsept-Tasarım: ŞT, ET; Literatür taraması: ET, ŞT; Yazma-inceleme-revizyon: ET; Kritik inceleme: ŞT.

Kaynaklar

1. Haddrill PR. Developments in forensic DNA analysis. *Emerg Top Life Sci* 2021; 5: 381-393.
2. Parson W, Ballard D, Budowle B, Butler JM, Gettings KB, Gill P et. al. Massively parallel sequencing of forensic STRs: considerations of the DNA commission of the international society for forensic genetics (ISFG) on minimal nomenclature requirements. *Forensic Sci Int Genet* 2016; 22: 54-63.
3. Borsting C, Morling N. Next generation sequencing and its applications in forensic genetics. *Forensic Science International: Genetics* 2015; 18 : 78-89.
4. De Knijff P. From next generation sequencing to now generation sequencing in forensics. *Forensic Sci Int Genet* 2019; 38: 175-180.
5. Bruijns B, Tiggelaar R, Gardeniers H. Massively parallel sequencing techniques for forensics: a review. *Electrophoresis* 2018; 39: 2642-2654.
6. Jager AC, Alvarez ML, Davis CP, Guzman E, Han Y, Way L et. al. Developmental validation of the miSeq FGx forensic genomics system for targeted next generation sequencing in forensic DNA casework and database laboratories. *Forensic Sci Int Genet* 2017; 28: 52-70.
7. Novroski NMM, Wendt FR, Woerner AE, Bus MM, Coble M, Budowle B. Expanding beyond the current core STR loci: an exploration of 73 STR markers with increased diversity for enhanced DNA mixture deconvolution. *Forensic Sci Int Genet* 2019; 38; 121-129.
8. Bright JA, Taylor D, Gittelson S, Buckleton J. The paradigm shift in DNA profile interpretation. *Forensic Sci Int Genet* 2017; 31; 24-32.
9. Coble MD, Bright JA. Probabilistic genotyping software: an overview. *Forensic Sci Int Genet* 2019; 38: 219-224.
10. An JH, Shin KJ, Yang WI, Lee HY. Body fluid identification in forensics. *BMB Rep* 2012; 45: 545-553.
11. Lewis C.A, Layne TR, Seashols-Williams SJ. Detection of microRNAs in DNA extractions for forensic biological source identification. *J Forensic Sci* 2019; 64: 1823-1830.
12. Bauer M. RNA in forensic science. *Forensic Sci Int Genet* 2007; 1: 69-74.
13. Sijen T. Molecular approaches for forensic cell type identification: on mRNA, miRNA, DNA methylation and microbial markers. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 18: 21-32.
14. Vennemann M, Koppelkamm A. mRNA profiling in forensic genetics I: possibilities and limitations. *Forensic Sci Int* 2010; 203: 71-75.
15. Glynn CL. Potential applications of microRNA profiling to forensic investigations. *RNA* 2020; 26: 1-9. Zubakov D, Boersma AW, Choi Y, van Kuijk PF, Wiemer EA, Kayser M. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med* 2010; 124: 217-226.
16. Wang Z, Zhang J, Luo H, Ye Y, Yan J, Hou Y. Screening and confirmation of microRNA markers for forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet* 2013; 7: 116-123.
17. Alshehhi S, Haddrill PR. Estimating time since deposition using quantification of RNA degradation in body fluid-specific markers. *Forensic Sci Int* 2019; 298: 58-63.
18. Kayser M. Forensic DNA phenotyping: predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 18: 33-48.
19. Parson W. Age Estimation with DNA: From Forensic DNA Finger printing to Forensic (Epi) Genomics: A Mini-Review. *Gerontology* 2018; 64(4): 326-332.
20. Wray NR, Yang J, Hayes BJ, Price AL, Goddard ME, Visscher PM. Pitfalls of predicting complex traits from SNPs. *Nat Rev Genet* 2013;14: 507-515.
21. Schneider PM, Prainsack B, Kayser M. The use of forensic DNA phenotyping in predicting appearance and biogeographic ancestry. *Dtsch Arztebl Int* 2020; 116: 873-880.
22. Kukla-Bartoszek M, Pos piech E, Spolnicka M, Karłowska-Pik J, Strapagiel D, Zadzin

- ska E et. al. Investigating the impact of age-dependent hair colour darkening during childhood on DNA-based hair colour prediction with the HIrisPlex system. *Forensic Sci Int Genet* 2018; 36: 26-33.
23. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007; 447: 396-398.
 24. Ohgane J, Yagi S, Shiota K. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. *Placenta* 2008; 22: 29-35.
 25. Vidaki A, Daniel B, Syndercombe Court D. Forensic DNA methylation profiling-potential opportunities and challenges. *Forensic Sci Int Genet* 2013; 7: 499-507.
 26. Alghanim H, Wu W, McCord B. DNA methylation assay based on pyrosequencing for determination of smoking status. *Electrophoresis* 2018; 39: 2806-2814.
 27. Vidaki A, Kalamara V, Carnero-Montoro E, Spector TD, Bell JT, Kayser M. Investigating the epigenetic discrimination of identical twins using buccal swabs, saliva, and cigarette butts in the forensic setting. *Genes* 2018; 9: 252.
 28. Richards R, Patel J, Stevenson K, Harbison S. Evaluation of massively parallel sequencing for forensic DNA methylation profiling. *Electrophoresis* 2018; 39: 2798-2805.
 29. Vidaki A, Kayser M. Recent progress, methods and perspectives in forensic epigenetics. *Forensic Sci Int Genet* 2018; 37: 180-195.
 30. Koch CM, Wagner W. Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. *Aging* 2011; 3: 1018-1027.
 31. Hong SR, Jung SE, Lee EH, Shin KJ, Yang WI, Lee HY. DNA methylation-based age prediction from saliva: high age predictability by combination of 7 CpG markers. *Forensic Sci Int Genet* 2017; 29: 118-125.
 32. Heidegger A, Xavier C, Niederstatter H, de la Puente M, Pospiech E, Pisarek A et. al. Development and optimization of the VISAGE basic prototype tool for forensic age estimation. *Forensic Sci Int Genet* 2020; 48: 102322. Mateen RM, Sabar MF, Hussain S, Parveen R, Hussain M. Familial DNA analysis and criminal investigation: usage, downsides and privacy concerns. *Forensic Sci Int* 2021; 318: 110576.
 33. Kling D, Phillips C, Kennett, D, Tillmar A. Investigative genetic genealogy: current methods, knowledge and practice. *Forensic Sci Int Genet* 2021; 52: 102474.
 34. Greytak EM, Moore C, Armentrout SL. Genetic genealogy for cold case and active investigations. *Forensic Sci Int* 2019; 299: 103-113.
 35. Chong KWY, Thong Z, Syn CKC. Recent trends and developments in forensic DNA extraction. *WIREs Forensic Sci* 2020; 3: 1395.
 36. Lynch C, Fleming R. A review of direct polymerase chain reaction of DNA and RNA for forensic purposes. *WIREs Forensic Sci* 2018; 1: 1335.
 37. De la Puente, M, Phillips C, Xavier C, Amigo J, Carracedo A, Partson W et al. Building a custom large-scale panel of novel microhaplotypes for forensic identification using miSeq and Ion S5 massively parallel sequencing systems. *Forensic Sci Int Genet* 2020; 45: 102213.