

Markery na X-chromozóme: minulosť, súčasnosť a budúcnosť

Anotácia: X-chromozomálne markery si našli uplatnenie vo forenzej praxi vďaka výstupom klinickej genetiky. Ich aplikácia je zameraná hlavne na testovanie príbuznosti (resp. tzv. *kinship analýzu*). Aj keď v bežných prípadoch typizácia X-STR markerov nie je potrebná, za určitých podmienok môže byť ich použitie kľúčové. Svoje využitie majú aj v populačných štúdiách a stopových analýzach. Táto štúdia sa nesústreďuje len na samotné STR markery, ale aj na špecifické vlastnosti chromozómu X, keďže práve tie sú kľúčovými prvkami správneho využitia X-STR markerov.

Kľúčové slová: DNA analýza, paternitné testovanie, X chromozóm, X-STR, kinship analýza.

1 Špeciálne vlastnosti chromozómu X

1.1 Základná charakteristika

Chromozóm X je jeden z páru pohlavných chromozómov. V somatických bunkách žien sa nachádza v dvoch kópiách, muži majú jeden X a jeden Y chromozóm. K evolučnému rozčleneniu gonozómov došlo približne pred 150 až 200 miliónmi rokov. Mutácia na vtedajších autozómoch v géne kódujúcom transkripčný faktor viedla k vytvoreniu nového variantu s vlastnosťami determinujúcimi pohlavie. V súčasnosti je táto alela reprezentovaná génom SRY na chromozóme Y a vedie ku vzniku mužského pohlavia.

1.2 Štruktúra

Ľudský chromozóm X patrí medzi stredne veľké submetacentrické chromozómy. Na terminálnom konci krátkeho ramena sa nachádza pseudoautozomálna oblasť PAR1 s dĺžkou 2,7 Mb, na konci dlhého ramena pseudoautozomálna oblasť PAR2 s dĺžkou 330 kb. Tieto regióny sa nachádzajú taktiež na chromozóme Y a vytvárajú tak homologické úseky medzi týmito dvoma chromozómami¹.

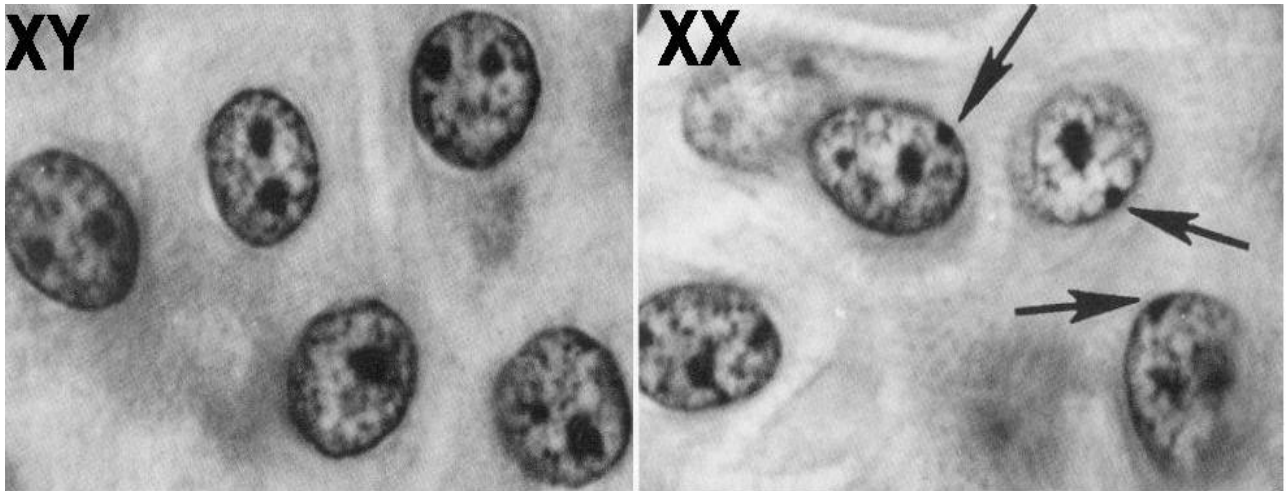
Na základe vyhodnotenia všetkých verejne publikovaných ľudských sekvencií a génov z iných organizmov bolo identifikovaných 1 098 génov (7,1 génu na megabázu) a 700 pseudogénov (4,6 na megabázu) na chromozóme X. Génová hustota, nepočítajúc pseudogény, je na chromozóme X najnižšia z doteraz anotovaných chromozómov. Exóny identifikovaných génov tvoria len 1,7 % sekvencie chromozómu X. Napriek tomu, že chromozóm X obsahuje len 4 % zo všetkých ľudských génov, takmer 10 % chorôb s mendelistickou dedičnosťou sa spája s chromozómom X. Chromozóm X obsahuje vo všeobecnosti krátke gény, pričom priemerná dĺžka génu na chromozóme X je 49 kilobáz, zatiaľ čo napríklad na chromozóme 13 je to 57 kilobáz. Napriek tomu sa na tomto chromozóme nachádza najväčší známy gén v ľudskom genóme, gén pre dystrofin (DMD), ktorý má rozpätie 2 220 223 bázových párov. Ďalšími významnými génmi na chromozóme X sú gény CT (*cancer – testis*)² antigénovej skupiny a sú charakteristické expresiou v množstve nádorov, kým expresia v zdravých tkanivách je lokalizovaná prevažne v semenníkoch. Tieto gény sú potenciálnym cieľom pre

¹ ROSS, M.T., GRAFHAM, D.V., COFFEY, A.J., SCHERER, S., MCLAY, K., et al. (2005). The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*. Vol.(7031): 325-337.

² CT skupina génov, z angličtiny cancer testis - gény, ktorých mutácie podmieňujú rakovinu semenníkov.

nádorovú imunoterapiu. Na chromozóme X sa nachádzajú taktiež gény pre nekódujúce RNA (tzv. ncRNA)^{3,4}.

1.3 Inaktivácia



Obr. 1: Na obrázku vpravo sú šípkami označené Barrove telieska v bunkách ženy, na obrázku vľavo sa Barrove telieska nenachádzajú, keďže ide o bunky muža⁵.

Keďže v somatických bunkách žien sa nachádzajú dve kópie chromozómu X a v mužských bunkách len jedna, je u žien potrebná kompenzácia dávky X-viazaných génov. To je dosiahnuté procesom inaktivácie jedného z chromozómov vo včasnom štádiu blastogenézy. Chromozóm, ktorý bude inaktívovaný, je bunkou zvolený náhodne, v niektorých bunkách sa inaktívuje X maternálneho, v iných paternálneho pôvodu. V následných generáciách danej línie je však inaktivácia fixovaná na ten istý chromozóm⁶.

1.4 Rekombinácia

1.4.1 Základná charakteristika

Rekombinácia je proces, ktorého výsledkom sú nové kombinácie génov. Gaméty obsahujúce tieto kombinácie sa nazývajú rekombinantné. Fyzickou podstatou rekombinácie je *crossing-over*, teda skutočný proces výmeny úsekov medzi homologickými chromozómami.

³ Sú to gény, ktorých produktmi nie sú proteíny, ale funkčné RNA. Z týchto génov stojí za zmienku hlavne XIST (*X inactive specific transcript*, z angl. X inaktívny špecifický transkript), ktorý sa podieľa na inaktivácii chromozómu X.

⁴ GRIFFITHS-JONES, S., MOXON, S., MARSHALL, M., KHANNA, A., EDDY, S., BATEMAN, A. (2005). Rfam: annotating non-coding RNAs in complete genomes. *Nucleic Acids Research*. Vol.(33): D121–D124; ROSS, M.T., GRAFHAM, D.V., COFFEY, A.J., SCHERER, S., MCLAY, K., et al. (2005). The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*. Vol.(7031): 325–337.

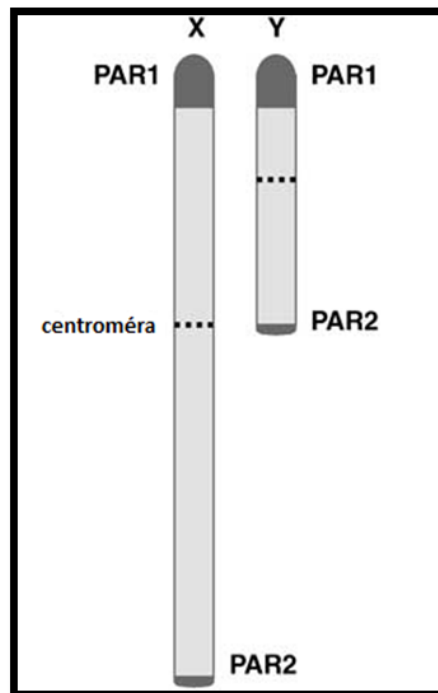
⁵ FERÁK, V., SRŠEŇ, Š. (1990). *Genetika človeka*. Slovenské pedagogické nakladateľstvo, 447, ISBN 80-08-00349-9.

⁶ Tento proces bol prvýkrát popísaný v roku 1961 genetičkou Mary Lyonovou na bunkách myšacích embryí. Inaktívovaný chromozóm nevyzerá a ani sa nespráva ako ostatné chromozómy. Pri jeho kondenzácii vzniká štruktúra nazývaná Barrovo teliesko, ktoré je lokalizované pri jadrovej membráne. Geneticky je tento chromozóm takmer inertný, avšak niektoré gény sú naďalej exprimované. To znamená, že inaktivácia nie je úplná, a preto osoby s odchýlkou od normálneho počtu chromozómov X nie sú úplne zdravé. Replikácia DNA inaktívovaného chromozómu prebieha neskôr ako v ostatných chromozómoch (Kadáši, 2010; Snustad a Simmons, 2009).

Odohráva sa v pachyténnom štádiu profázy prvého meiotického delenia, keď sa chromozómy párujú a vytvárajú tzv. tetrády. Aj keď je tetráda tvorená štyrmi homologickými chromatidami, k prekríženiu v každom mieste dôjde len medzi dvoma z nich. V mieste prekríženia vznikne zlom a časti chromatid sa spoja tak, že vzniknú rekombinanty. Zvyšné dve chromatidy v danom mieste rekombinované nie sú. V rámci jednej tetrády môže dôjsť k viacerým výmenám na rôznych miestach. *Crossing-over* je v takýchto prípadoch dvojitý, trojitý alebo až štvornásobný. V diploténnom štádiu profázy prvého meiotického delenia môžeme pozorovať cytologický dôkaz *crossing-overu*, tzv. chiazmy. Spárované chromozómy sa vtedy mierne odpudzujú a v tesnej blízkosti ostávajú len centromerické oblasti a oblasti prekríženia⁷.

1.4.2 Pseudoautozomálne oblasti

V somatických bunkách žien sa nachádzajú dva chromozómy X, ktoré sú rovnaké tak z hľadiska veľkosti, ako aj genetického obsahu, a preto sa navzájom môžu rekombinovať po celej dĺžke. Muži majú jeden X a jeden Y chromozóm. K rekombinácii medzi nimi dochádza vďaka prítomnosti regiónov, ktoré sa nazývajú pseudoautozomálne a sú lokalizované na koncoch dlhého a krátkeho ramena oboch chromozómov⁸.



Obr. 2: Lokalizácia oblastí PAR1 a PAR2 na chromozómoch X a Y⁹.

Pseudoautozomálne oblasti sa navzájom rekombinujú rovnako, ako je to pri autozómoch, avšak aktivita rekombinácie sa v PAR1 medzi pohlaviami líši. U mužov je najvyššia frekvencia rekombinácie z celého genómu práve v tejto oblasti. Strata PAR1 je asociovaná s mužskou sterilitou, keďže táto oblasť je potrebná pre správne párovanie

⁷ SNUSTAD, D.P., SIMMONS, J.M. (2009). Genetika. Masarykova univerzita- Nakladatelství, 871, ISBN 978-80-210-4852-2.

⁸ ROSS, M.T., GRAFHAM, D.V., COFFEY, A.J., SCHERER, S., MCLAY, K., MUZNY, D., et al (2005). The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*. Vol.(7031): 325-337.

⁹ FLAQUER, A., RAPPOLD, G.A., WIENKER T.F., FISCHER, Ch. (2008). The human pseudoautosomal regions: a review for genetic epidemiologists. *European Journal of Human Genetics*. Vol.(16): 771-779.

chromozómov X a Y pri meióze a pre ich správnu segregáciu do gamét. Pravdepodobnosť rekombinácie v PAR2 je nižšia ako v PAR1, ale vyššia ako v autozomálnych oblastiach¹⁰. Nové štúdie dokazujú prítomnosť ďalšej pseudoautozomálnej oblasti PAR3, ktorá sa nachádza v oblasti Xq.21.3 na chromozóme X a v oblasti Yp11.2¹¹.

1.4.3 Väzba génov a väzbová nerovnováha

Gény, ktoré sa nachádzajú na rovnakom chromozóme, meiózou putujú spoločne. Alely jednotlivých génov sa môžu rekombinovať, pričom pravdepodobnosť tohto javu závisí od vzdialenosti medzi nimi. Percentuálne vyjadrenie pravdepodobnosti meiotickej rekombinácie medzi dvoma lokusmi udáva tzv. rekombinačná frekvencia – θ . Ak $\theta = 1$, hovoríme o úplnej väzbe. O voľnej kombinovateľnosti zasa hovoríme ak $\theta = 0,5$ ¹².

Na vyjadrenie možnosti, že sa alely na rôznych lokusoch budú dediť spoločne, sa používajú termíny *linkage disequilibrium* (väzbová nerovnováha) a *linkage equilibrium* (väzbová rovnováha). Ak sú alely zoskupené náhodne, hovorí sa, že sú vo väzbovej rovnováhe. Väzbová nerovnováha znamená, že alely sú zoskupené nenáhodne. Inými slovami, je to buď častejšia, alebo menej častá prítomnosť určitých kombinácií alel, ako by sa dalo očakávať pri náhodnej formácii haplotypov. Miera, akou sú alely asociované do haplotypu, sa nazýva parameter väzbovej nerovnováhy a značí sa písmenom D. Matematicky ide o rozdiel medzi frekvenciami gamét s danými alelami vo fáze *cis* a frekvenciami gamét s alelami vo fáze *trans*. Pri nezávislom formovaní haplotypov sú frekvencie gamét vo fázach *cis* a *trans* rovnaké. V takomto prípade sa parameter väzbovej nerovnováhy rovná nule, čiže ide o väzbovú rovnováhu. Takisto sa dá D popísať ako odchýlka medzi frekvenciou určitých gamét a ich očakávanou frekvenciou. Nevýhodou tohto parametra je, že jeho maximálna hodnota sa mení v závislosti od alelových frekvencií. Preto sa D vyjadruje ako percento z jeho najvyššej hodnoty D_{\max} ¹³.

Väzbová nerovnováha sa môže zvyšovať dôsledkom malej veľkosti populácie, genetického posunu, efektu zakladateľa, konsangvinných manželstiev a selekcie. Opačný efekt má rekombinácia, ktorá vedie k väzbovej rovnováhe.

2 STR markery

2.1 Základná charakteristika

STR (*short tandem repeats*, z angl. krátke tandemové repetície) alebo mikrosatelity predstavujú polymorfné tandemové repetície so sekvenciou dlhou 2 až 5 párov nukleotidov¹⁴. Počet repetícií udáva dĺžku mikrosatelitu. Dĺžka sa v priebehu evolúcie mení v dôsledku „pošmyknutia“ pri replikácii DNA. Táto forma mutácie spôsobuje, že sa komplementárne vlákna navzájom posunú o dĺžku základnej repetície. Medzi jedincami je počet opakovaní

¹⁰ MATSUDA, Y., HIROBE, T., CHAPMAN, V.M.(1991). Genetic basis of X-Y chromosome dissociation and male sterility in interspecific hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*. Vol.(88): 4850-4854.

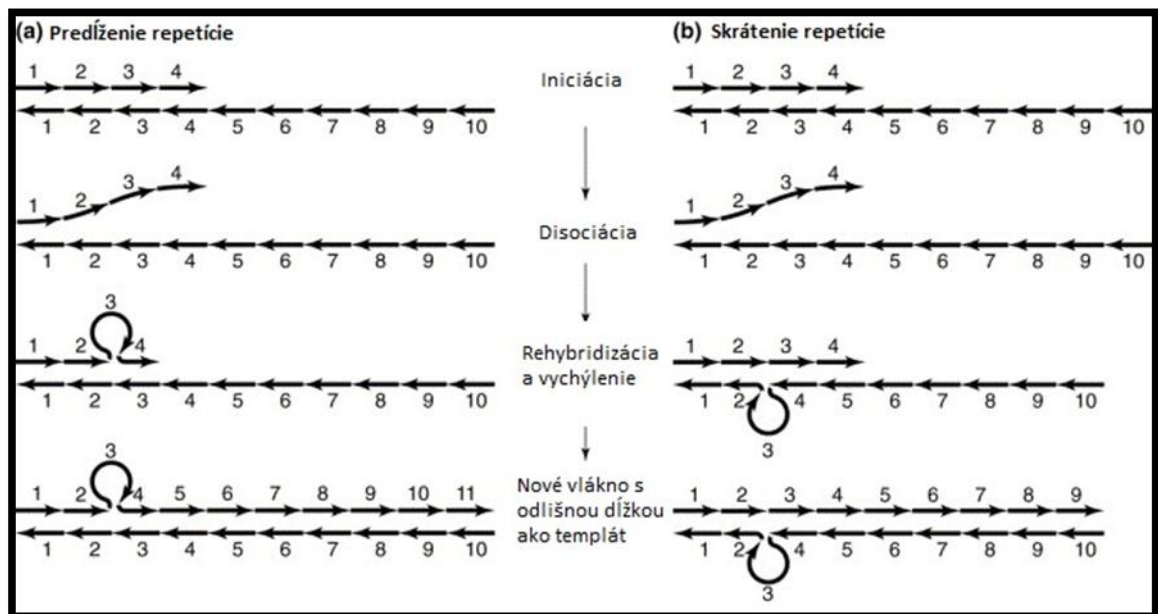
¹¹ VEERAPPA, A.M., PADAKANNAYA, P., RAMACHANDRA, N.B. (2013). Copy number variation-based polymorphism in a new pseudoautosomal region 3 (PAR3) of a human X-chromosome-transposed region (XTR) in the Y chromosome. *Funct. Integr. Genomics*. Vol.(13): 285-293.

¹² KADÁŠI, Ľ. (2010). Genetika človeka. Vydavateľstvo Univerzity Komenského v Bratislave, 112, ISBN 978-80-223-2849-4

¹³ HAMILTON, M.B. (2009). Population Genetics. Wiley–Blackwell, 396, ISBN 978-1-4051-3277-0.

¹⁴ SNUSTAD, D.P., SIMMONS, J.M. (2009). Genetika. Masarykova univerzita- Nakladatelství, 871, ISBN 978-80-210-4852-2.

základnej repetície vďaka tomuto mechanizmu vysoko variabilný, čo robí mikrosatelity efektívnymi genetickými markermi^{15,16}.



Obr. 3: Model mutácie mikrosatelitu „pošmyknutím“ pri replikácii. Jednotky repetície sú znázornené šípkou. (a) Počas syntézy repetitívnych úsekov vlákna DNA disociujú. Ak sa vlákna pri reasociácii navzájom vychýlia, vznikne slučka v smere replikácie, ktorá spôsobí predĺženie mikrosatelitu. (b) Rovnako ako (a), ale slučka vzniká v protismere replikácie a mikrosatelit sa skracuje¹⁷.

Na základe vzoru opakovania STR markery rozdeľujeme na: (a) jednoduché repetície, ktorých jednotky majú identickú sekvenciu aj veľkosť, (b) zložené repetície, ktoré pozostávajú z viacerých priľahlých jednoduchých repetícií, (c) komplexné repetície, ktoré môžu obsahovať viaceré repetitívne bloky s variabilnou dĺžkou jednotky repetície a jednotlivé bloky môžu byť prerušené sekvenciami variabilných dĺžok, (d) komplexné hypervariabilné repetície, ktoré sú charakteristické mnohými alelami líšiacimi sa aj v dĺžke, aj sekvencií, a preto je ich typizácia značne náročná¹⁸.

2.2 Distribúcia v genóme

Mikrosatelity, alebo krátke tandemové repetície, tvoria asi 3 % ľudského genómu. Dominujú dvojnukleotidové opakovania a z nich sa najčastejšie vyskytujú $(AC)_n$ repetície. V roku 1996 bola publikovaná súhrnná mapa 5264 AC mikrosatelitov¹⁹. Trojnukleotidové repetície sú často spájané s rôznymi ochoreniami. Príkladom je syndróm fragilného chromozómu X, ktorý vzniká zvýšením počtu CCG trinukleotidu²⁰. Keďže sa často vyskytujú

¹⁵ LEVINSON, L., GUTMAN, G.A. (1987). Slipped-Strand Mismatching: A Major Mechanism for DNA Sequence Evolution. *Mol. Biol. Evol.* Vol.(3): 203-221.

¹⁶ ELLEGREN, H. (2000). Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics.* Vol.(16): 551-558.

¹⁷ ELLEGREN, H. (2000). Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics.* Vol.(16): 551-558.

¹⁸ BUTLER, J.M. (2005). Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. Elsevier Academic Press, 647, ISBN 0-12-147952-8.

¹⁹ DIB, C., FAURÉ, S., FIZAMES, C., SAMSON, D., DROUOT, N., et al. (1995). A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature.* Vol.(380): 152-154.

²⁰ SUTHERLAND, G.R., RICHARDS, R.I. (1995). Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* Vol.(9): 3636-3641.

v exónoch, kde nerušia čítací rámec, nie sú veľmi využívané v populačných štúdiách²¹. Zo štvornukleotidových opakovaní sú časté GATA a GACA repetície, ktoré sa vo zvýšenej miere nachádzajú v blízkosti centromér.

2.3 Využitie

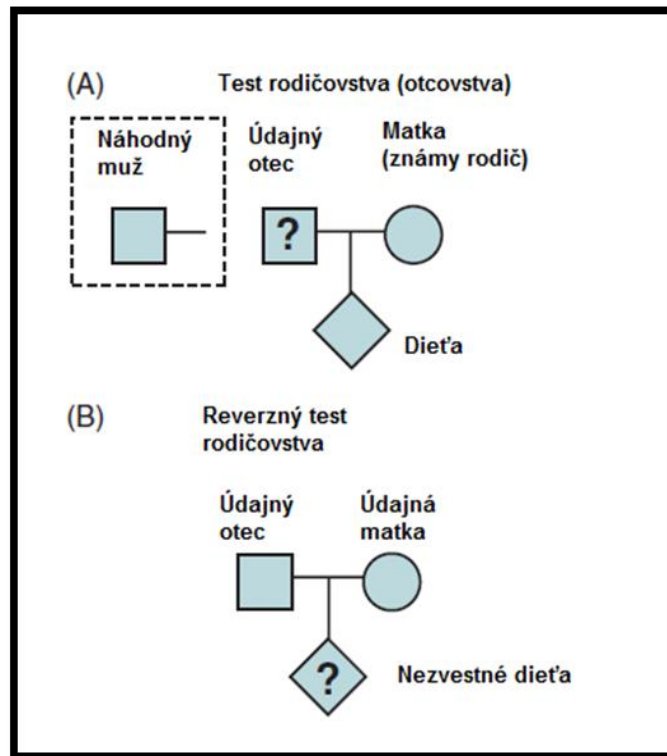
Počet opakovaní základnej repetície v STR markeroch je vysoko variabilný medzi jedincami. Mnohonásobný alelizmus (vo všeobecnosti viac ako 10 alel pre bežne používaný marker) v populácii umožňuje vysokú mieru diskriminácie medzi jedincami v rámci populácie, ak sa využije viacero takýchto markerov. Vďaka tomu sú cenným nástrojom na genetické mapovanie, väzbové analýzy a na individuálnu identifikáciu osôb.

Napriek tomu, že sa v genóme človeka nachádzajú tisíce mikrosatelitov, len malé množstvo sa využíva vo forenznej praxi. Najčastejšie sa využívajú markery so štvornukleotidovými základnými repetíciami, keďže pri ich amplifikácii nevznikajú anomálie v takých množstvách ako pri amplifikácii markerov s kratšími základnými opakovaniami. Navyše, dve alely, ktorých rozdiel v dĺžke je rovný štyrom bázovým párom, sú ľahšie od seba rozlíšiteľné ako alely, ktoré sa líšia o dĺžku troch, prípadne dvoch báz.

Forezný genetik sa zaoberá stanovením DNA profilu (haplotypu) biologických stôp zaistených na mieste činu a následným porovnaním tohto profilu s DNA profilmi porovnávacích materiálov relevantných osôb (poškodení, domáce osoby, svedkovia, podozriví, obvinení atď.). V prípade individuálnej identifikácie ide o zhodu všetkých vyšetrených STR markerov v rámci DNA profilov zistených zo skúmanej stopy a porovnávacieho materiálu. Ak ale zisťujeme príbuznosť medzi osobami, skúma sa, do akej miery sa zhoduje genetická informácia daných jedincov. Pri klasickom testovaní rodičovstva sa najčastejšie vyskytuje otázka otcovstva. Pri paternitných štúdiách sa určuje celý trojuholník: matka + otec + dieťa. Informácia len otec – dieťa nie je úplná a štatisticky korektná. Pri identifikácii mŕtvol sa taktiež hľadá väčší počet príbuzných a robia sa testy príbuznosti (napríklad biologický potomok a biologický rodič, prípadne obaja rodičia a pod.). Pri nezvestných osobách a hromadných katastrofách sa využívajú reverzné testy rodičovstva. V tomto prípade sú genotypy rodičov známe a podľa nich sa odhaduje genotyp potomka. Otázkou pri tomto type analýzy je, či pochádzajú dané pozostatky od dieťaťa rodičov, ktorých vzorky skúmame. Ak nie sú dostupné vzorky DNA od rodičov alebo potomkov nezvestnej osoby, analyzuje sa DNA iných príbuzných danej osoby²².

²¹ JURKA, J., PETHIYAGODA, Ch. (1995). Simple Repetitive DNA Sequences from Primates: Compilation and Analysis. *J. Mol. Evol.* Vol.(40): 120-126.

²² BUTLER, J.M. (2011). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Elsevier Academic Press, 659, ISBN 978-0-12-374513-2.



Obr. 4: Ilustrácia otázok kladených pri (a) testovaní rodičovstva a (b) reverznom testovaní rodičovstva. Pri testovaní rodičovstva sa najčastejšie testuje otcovstvo. Vzorky matky a dieťaťa sa využívajú na potvrdenie, či údajný otec mohol skutočne splodiť dané dieťa v porovnaní s náhodným mužom. Pri reverznom teste sa využívajú genotypy údajných rodičov na zistenie, či pozorovaný genotyp môže pochádzať od dieťaťa týchto rodičov (upravené podľa ²³).

Pri niektorých typoch testovania príbuznosti sa využívajú aj doplnkové markery. Väčšia časť chromozómu Y sa odovzdáva z otca na syna priamo, bez rekombinácie. Preto sú markery na Y-chromozóme vhodné na príbuzenské testovania, kde sa analyzuje vzťah otec – syn, resp. celá paternálna línia. **Vzťah ženy a jej matky alebo starej matky môžeme zasa analyzovať s využitím X-STR markerov.** Keďže sa mitochondriálna DNA dedí len po maternálnej línii, jej analýza je tiež vhodná na testovanie týchto vzťahov.

Pri testovaní príbuzenstva je potrebné počítať aj s mutáciami. Väčšina laboratórií zaoberajúca sa príbuzenským testovaním akceptuje pravidlo dvoch vylúčení. Toto pravidlo hovorí o tom, že ak sa nezhodujú dva lokusy medzi údajným otcom (rodičom) a potomkom, nemôže byť tento údajný otec vylúčený ako biologický otec. Čím viac markerov skúmame, tým je väčšia šanca, že spozorujeme náhodné mutácie. Keďže sa pri STR analýze skúma viacej lokusov naraz²⁴, takáto nezhoda medzi dieťaťom a biologickým otcom nie je vylúčená.

Za posledné dve desaťročia boli jednoznačne definované sady vyšetrovaných STR systémov všeobecne aplikovaných pri individuálnej identifikácii osôb a na ten účel vyvinuté komerčne dostupné kity používané vo všetkých svetových laboratóriách. V štandardných situáciách postačuje analýza sady základných (CODIS) DNA markerov (13) na určenie zhody DNA profilu spornej vzorky a referenčného (porovnávacieho) materiálu. Napriek všetkému stále ostáva problematická interpretácia niektorých výstupov DNA analýzy. V takýchto prípadoch je potrebné rozšíriť panel skúmaných markerov alebo použiť ďalšie analyzačné metódy, ktoré by spresnili získané dáta. V súčasnosti čoraz viac rastie význam X-STR

²³ BUTLER, J.M. (2011). Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. Elsevier Academic Press, 659, ISBN 978-0-12-374513-2

²⁴ V dnešnej dobe sú bežné komerčné kity konfigurované na 15 STR markerov, najnovšie kity až na 24 STR.

polymorfizmov, ktoré sa nachádzajú u oboch pohlaví a ich využitie má širokú perspektívu najmä pri vyšetovaní paternitných sporov (určovanie otcovstva v prípade plodu ženského pohlavia, keď nie je možné využiť dedičnosť Y chromozómu). DNA markery na chromozóme X sú tiež potenciálne silným nástrojom pri riešení komplexných príbuzenských vzťahov. Nosnou aplikáciou pri X-STR markeroch je určovanie otcovstva, najmä v prípadoch, keď sú dostupné len porovnávacie materiály osôb ženského pohlavia s hypoteticky spoločným príbuzným mužského pohlavia^{25,26}.

3 STR markery na chromozóme X

3.1 História

V súvislosti s markermi na chromozóme X bolo prvým výrazným úspechom objavenie krvnej skupiny Xgal. Neskôr, počas éry PCR, bolo objavených mnoho STR markerov, niektoré z nich práve na chromozóme X. Prvými dvoma markermi na chromozóme X, ktoré boli využité na typizáciu, boli markery HPRTB a ARA²⁷.

Myšlienka využitia X-chromozomálnych markerov vo forenznej praxi vzišla zo skúseností v oblasti klinickej genetiky. Poznáme mnoho ochorení (napríklad hemofília, Duchennova svalová dystrofia, daltonizmus a pod.), ktoré si viazané na chromozóm X. Ak je muž postihnutý takýmto ochorením fertílly, všetky jeho dcéry budú nositeľkami defektného X chromozómu a tento chromozóm odovzdajú do polovice svojho potomstva. U všetkých mužov s defektným chromozómom X sa daná choroba prejaví, kvôli hemizygotnému stavu chromozómu X. Navyše, ak sa u muža prejaví dva alebo viac X-viazaných znakov, je zrejme, že alely týchto lokusov tvoria haplotyp. Pochopenie princípu dedičnosti chromozómu X je cenným nástrojom nielen pre klinickú genetiku, ale aj pre príbuzenské testovanie.

3.2 Väzbová nerovnováha

Alely viazaných lokusov tvoria haplotypy, ktoré sa navzájom rekombinujú s frekvenciou korešpondujúcou s genetickou vzdialenosťou medzi markermi. Pri markeroch na chromozóme X je tento fenomén limitovaný na meiózu v bunkách ženy. Pri príbuzenskom testovaní musia byť haplotypy tesne viazaných STR analyzované ako celky. Väzbová nerovnováha, ktorá hovorí o nenáhodnom združení alel na rôznych lokusoch, je menšia pri STR markeroch ako pri SNP (*single nucleotide polymorphism*, z angl. jednonukleotidový polymorfizmus), keďže STR sa vyznačujú vyššou pravdepodobnosťou výskytu mutácie. Napriek tomu sa vyskytovať môže, čo sa musí brať do úvahy pri aplikácii týchto markerov v praxi. V niektorých oblastiach chromozómu X bola zistená väzbová nerovnováha medzi markermi genotypizáciou mužských DNA vzoriek. Významná väzbová nerovnováha bola spozorovaná napríklad medzi markermi DXS10079, DXS10074 a DXS10075. Napriek tomuto fenoménu majú STR klastre vysokú dôkaznú hodnotu pri príbuzenských testovaniach²⁸.

Štúdie väzbovej nerovnováhy medzi mikrosatelitmi, a v poslednom čase aj medzi SNP markermi, poskytli nový pohľad na pôvod a históriu ľudských populácií. Napríklad v afrických populáciách sa väzbová nerovnováha nevyskytuje v takej miere ako v iných

²⁵ SZIBOR, R., KRAWCZAK, M., HERING, S., EDELMANN, J., KUHLSCH, E., KRAUSE, D. (2003). Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int. J. Legal. Med.* Vol.(117): 67-74

²⁶ SZIBOR, R., HERING, S., KUHLSCH, E., PLATE, I., DEMBERGER, S., KRAWCZAK, M., EDELMANN, J. (2005). Haplotyping of STR cluster DXS6801–DXS6809–DXS6789 on Xq21 provides a powerful tool for kinship testing. *Int. J. Legal. Med.* Vol.(119): 363-369

²⁷ SZIBOR, R. (2007). X-chromosomal markers: Past, present and future. *FCI.* Vol.(1): 93-99.

²⁸ SZIBOR, R. (2007). X-chromosomal markers: Past, present and future. *FCI.* Vol.(1): 93-99.

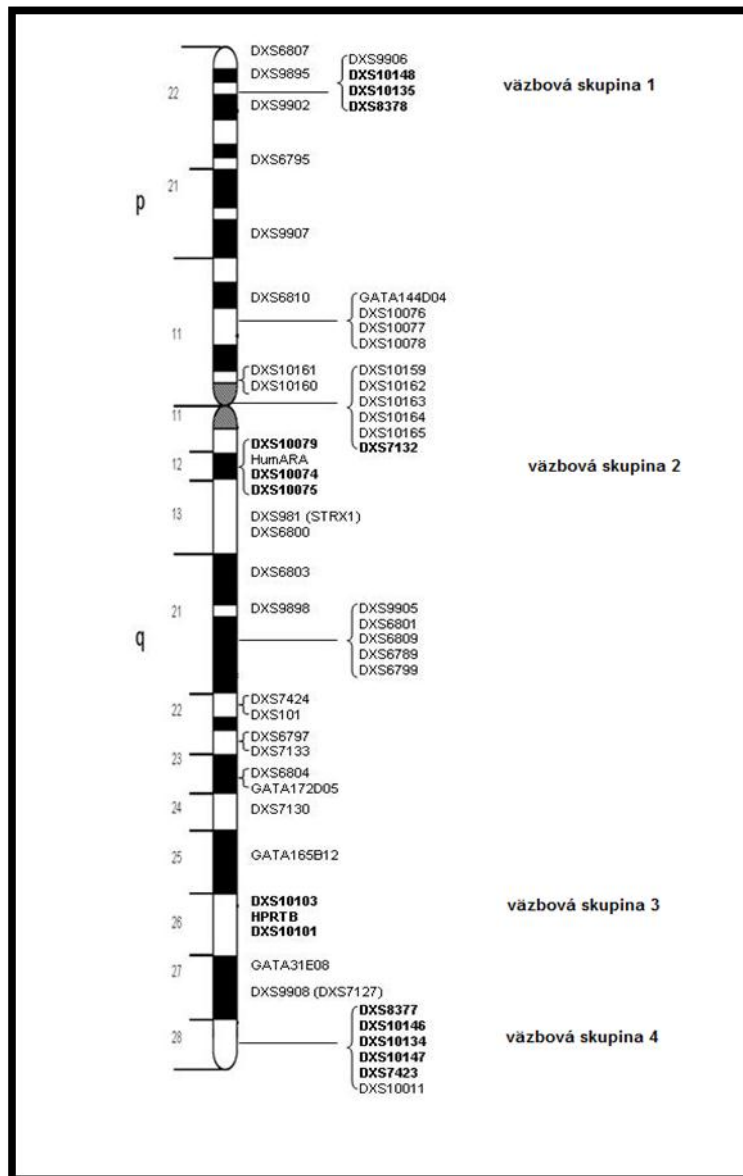
populáciách. Táto skutočnosť sa dá vysvetliť bottleneckom, ktorý je asociovaný s pôvodom neafrických populácií. Práve štúdium väzbovej nerovnováhy na chromozóme X môže byť vysoko účinné pri odhaľovaní etnických rozdielov²⁹.

3.3 Markery vo forenznej praxi

Ak sú markery vo väzbe, neselegujú nezávisle. Na využitie vo forenznej praxi sa chromozóm X rozdelil na 4 väzbové skupiny (lokalizované na Xp22.2, Xq12, Xq26 a Xq28), ktoré poskytujú nezávislé informácie o genotype. Z každej z týchto skupín sa z praktických dôvodov vybral jeden marker (konkrétne to boli markery: DXS8378, DXS7132, HPRTB a DXS7423). Tento súbor štyroch markerov, ktoré nie sú vo väzbe (plus amelogenín na určenie pohlavia), sa využíval na typizáciu s využitím prvého komerčného kitu na amplifikáciu X-STR markerov. Tento kit sa nazýva Mentype® Argus X-UL. Neskôr bol kit rozšírený o ďalšie markery. Novší kit Mentype® Argus 8-X predstavuje štyri klastre markerov (DXS10135–DXS8378, DXS7132–DXS10074, HPRTB–DXS10101, DXS7423–DXS10134) spolu s amelogenínom. Dvojice markerov tvoria stabilné haplotypy. Pravdepodobnosť rekombinácie v rámci jednotlivých klasterov je menšia ako 0,5 %. Potvrdenie tohto predpokladu, ktorý je založený na ich fyzickej lokalizácii, vyžaduje pozorovanie segregácie alel v niekoľkých stovkách súrodenciev. Aby sa vytvoril ešte spoľahlivejší systém typizácie, vytvoril sa Investigator Argus X-12 PCR amplifikačný kit, ktorý obsahuje 12 markerov, konkrétne DXS10148, DXS10135, DXS8378 (väzbová skupina 1); DXS7132, DXS10079, DXS10074 (väzbová skupina 2); DXS10103, HPRTB, DXS10101 (väzbová skupina 3) a DXS10146, DXS10134, DXS7423 (väzbová skupina 4)³⁰.

²⁹ SZIBOR, R. (2007). X-chromosomal markers: Past, present and future. *FCI*. Vol.(1): 93-99.

³⁰ NOTHNAGEL, M., SZIBOR, R., VOLLRATH, O., AUGUSTIN, Ch., EDELMANN, J., GEPPERT, M., et al. (2012). Collaborative genetic mapping of 12 forensic short tandem repeat (STR) loci on the human X chromosome. *FCI*. Vol.(6): 778-784.



Obr. 5: Idiogram chromozómu X.

3.3 Využitie

3.3.1 Príbuzenské testovania

3.3.1.1 Testy otcovstva

Otcovstvo v klasickej konštelácii matka, potomok a možný otec sa určuje zväčša iba pomocou autozomálnych markerov. Ak sa však testuje vzťah otca a dcéry, je vhodné použiť X-STR markery. Sú to najmä prípady s ťažko analyzovateľnými vzorkami, napríklad z exhumovaných tiel, kde už môže byť DNA značne degradovaná. Štatistickou silou v takýchto prípadoch musí disponovať malé množstvo STR markerov malej veľkosti. Markery na chromozóme X sú vhodné pre tieto prípady³¹.

Pri testovaní otcovstva, kde sú medzi možnými otcami dvaja pokrvní príbuzní, môže byť opäť výhodnejšie použiť X-STR markery. Napríklad, ak sú dvaja potenciálni

³¹ SZIBOR, R., KRAWCZAK, M., HERING, S., EDELMANN, J., KUHLISCH, E., KRAUSE, D. (2003). Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int. J. Legal. Med.* Vol.(117): 67–74.

otcovia vo vzťahu otec – syn, je isté, že **nebudú mať žiadne alely na chromozóme X identické pôvodom, a preto je vhodnejšie využiť markery na chromozóme X.** Naopak, bratia majú rovnaké alely na chromozóme X s pravdepodobnosťou 0,5. Je to rovnaká pravdepodobnosť ako pri autozómoch³².

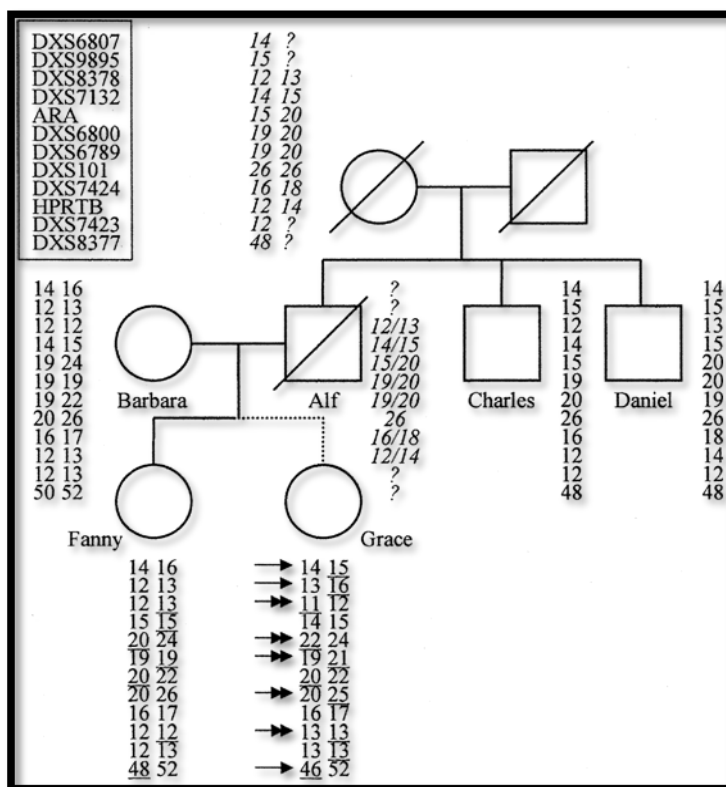
Najväčšiu výhodu poskytujú X-STR markery v prípadoch, keď nie je dostupná vzorka DNA od potenciálneho otca. Kľúčovú úlohu zohráva pritom jeho matka, keďže sa podľa nej dá určiť presný genotyp na chromozóme X jej syna. Ak takéto vzorky nie sú k dispozícii, môže byť jej genotyp zrekonštruovaný pomocou vzoriek od jej detí. Ak má viacero dcér, je možné určiť parentálny pôvod väčšiny ich alel, a teda aj genotyp starej matky.

Ak majú dve ženy rovnakého otca, tak majú rovnaký paternálny chromozóm X. Skúmanie markerov na tomto chromozóme u dvoch sestier môže vylúčiť otcovstvo, najmä pri prítomnosti štyroch rôznych alel, i keď nie sú k dispozícii vzorky DNA ani od jedného z rodičov. Autozomálne markery v takýchto prípadoch tieto informácie poskytnúť nemôžu. Potvrdenie otcovstva je tiež možné bez dostupných vzoriek od rodičov, ale je vo všeobecnosti menej dôveryhodné. Je to preto, že sestry zvyčajne nenesú úplne rovnaké haplotypy ako ich matka. Prenesenie dvoch maternálnych, nerekombinantných chromozómov X do potomstva nie je síce nemožné, ale veľmi nepravdepodobné.

Možnosť vytvorenia mutácie komplikuje forenzné analýzy. Pri rutinnom testovaní môže byť vylúčené otcovstvo na základe rozdielnej alely medzi dieťaťom a potenciálnym otcom. Táto nezhoda však môže byť výsledkom mutácie v parentálnej gaméte. Otcovstvo môže byť následne vyvrátené napriek tomu, že ide o skutočného otca dieťaťa. Z tohto dôvodu je vždy dôležité pri testovaní otcovstva prihliadať aj na možnosť mutácie³³. Dawid, Mortera a Pascali 2001 preto vytvorili metódu, v ktorej sa berie do úvahy možnosť mutácie pri určovaní paternity v prípadoch, keď je zrejmé vylúčenie otcovstva.

³² SZIBOR, R., KRAWCZAK, M., HERING, S., EDELMANN, J., KUHLISCH, E., KRAUSE, D. (2003). Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int. J. Legal. Med.* Vol.(117): 67-74.

³³ SZIBOR, R., KRAWCZAK, M., HERING, S., EDELMANN, J., KUHLISCH, E., KRAUSE, D. (2003). Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int. J. Legal. Med.* Vol.(117): 67-74.



Obr. 6: Test príbuznosti dvoch potenciálnych sestier. STR genotypy sú znázornené v ľavom hornom rohu obrázka. Predpokladaný genotyp je napísaný kurzívou. Alely potrebné na stanovenie príbuzenstva sú podčiarknuté. Jednoduchá šípka ukazuje na markery, pre ktoré sú alely „Fanny“ a „Grace“ odlišné, čo vyvracia ich sestersťvo. Dvojité šípky ukazujú na markery, ktoré vylučujú možnosť, že by bol „Alf“ otcom „Grace“³⁴.

3.3.1.2 Testy materstva

Existuje množstvo situácií, keď je vyžadované určenie materstva. Faktom je, že v modernej dobe sa rodí veľa nemanželských detí, a preto je identifikácia pozostatkov vhodnejšia podľa matky obete. Tento vzťah je možné určiť sekvenovaním mitochondriálnej DNA, čo je však drahá metóda a navyše nie vždy ponúka takú úroveň istoty, aká je vyžadovaná vo forennej praxi. Ide hlavne o prípady, keď sa skúmajú jedinci, pre ktorých nie sú dostupné potrebné populačné dáta. Typizácia markerov na chromozóme X je v takomto prípade vhodnou alternatívou na testovanie materstva. **Ak sa testuje vzťah matka – dcéra, tak sú tieto markery ekvivalentné k autozomálnym. Ak však testujeme vzťah matka – syn, je výhodné využiť práve X-STR markery.**

3.3.1.3 Obmedzenia

Neočakávané a nedetekované aberantné gonozomálne genotypy v potomstve môžu ovplyvniť presnosť príbuzenských testovaní pomocou chromozómu X. Ak sa zdá, že je viacero tesne viazaných markerov homozygotných, je možné, že ide o Turnerov syndróm alebo o syndróm androgénnej necitlivosti. Spôsob, akým tieto ochorenia narúšajú testy príbuznosti, je ekvivalentný autozomálnej uniparentálnej dizómii. Pri tejto chorobe jedinec dedí dve kópie chromozómu od jedného rodiča a od druhého ani jednu kópiu. Tak ako pri autozomálnych markeroch, ak je otcovstvo vylúčené na základe homozygotity X-chromozomálnych markerov, je potrebné tento výsledok overiť ďalšou analýzou.

³⁴ SZIBOR, R., KRAWCZAK, M., HERING, S., EDELMANN, J., KUHLSCH, E., KRAUSE, D. (2003). Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int. J. Legal. Med.* Vol.(117): 67-74.

Klinefelterov syndróm môže byť detekovaný, ak markery vykazujú heterocygozitu. Ak sú detekované gonozomálne aberácie alebo syndróm androgénnej necitlivosti, typizácia chromozómu X už nie je vhodnou metódou na príbuzenské testovanie. Takéto prípady sú však veľmi zriedkavé³⁵.

3.3.2 Stopové analýzy

Pri stopových analýzach sa väčšinou nevyžaduje analýza X-STR markerov. V zmiešaných (muž/žena) stopách je šanca, že sú všetky mužské alely zahrnuté v ženskej zložke vyššej pri X-STR markeroch. Preto sa neodporúča analyzovať X-chromozomálne markery pri testovaní mužskej vzorky, ktorá je kontaminovaná ženskou DNA. Avšak **pri identifikácii ženskej vzorky kontaminovanou mužskou DNA sú X-STR efektívnejšie, keďže ženské alely môžu byť úplne obsiahnuté v mužskej vzorke len vtedy, ak by boli homozygotné pre všetky lokusy. Vďaka tomu sa tieto markery často využívajú pri stanovovaní ženských stôp nájdených na mužovi podozrivom zo znásilnenia**³⁶.

Záver

Najviac požívané genetické markery na identifikáciu osôb sú autozomálne krátke tandemové repetície. Okrem nich sa využívajú aj doplnkové markery, a to mitochondriálne, Y-chromozómové a X-chromozómové. Vďaka špecifickému spôsobu dedičnosti chromozómu X sú markery na tomto chromozóme vhodnými kandidátmi na aplikáciu v niektorých typoch príbuzenských analýz. V súčasnosti je do forenznej praxe zavedených viac ako 40 X-STR markerov a takisto bolo publikované veľké množstvo populačných dát. Haplotypizácia X-STR markerov môže byť nápomocná najmä pri testovaní príbuznosti, v prípadoch, keď nie je dostupná vzorka DNA jedného z rodičov. Stúpajúci dopyt po X-chromozomálnych markeroch vyžadovalo vyvinutie štandardizovaných komerčných kitov. Z prvého takéhoto kitu, ktorým bolo možné analyzovať štyri genetické markery, sa postupne prešlo až na najnovší, ktorý je schopný analyzovať až dvanásť markerov. Ďalším významným pokrokom v aplikácii X-chromozomálnych markerov by mohlo byť využitie inzerčno-delečného (tzv. *in-del*) polymorfizmu na chromozóme X. Pri tomto polymorfizme je možné navrhnúť primery tak, aby sa amplifikovali len krátke úseky DNA, čo by umožnilo úspešnú analýzu aj takých vzoriek, ako sú kostrové pozostatky.

PodĎakovanie

„Táto štúdia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti bezpečnostného výskumu kód ITMS: **26240120034**, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.“

Literatúra

BUTLER, J.M. (2005). Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. Elsevier Academic Press, 647, ISBN 0-12-147952-8.

³⁵ SZIBOR, R. (2007). X-chromosomal markers: Past, present and future. *FCI*. Vol.(1): 93-99.

³⁶ SZIBOR, R., KRAWCZAK, M., HERING, S., EDELMANN, J., KUHLISCH, E., KRAUSE, D. (2003). Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int. J. Legal. Med.* Vol.(117): 67-74.

- BUTLER, J.M. (2011). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Elsevier Academic Press, 659, ISBN 978-0-12-374513-2.
- DIB, C., FAURÉ, S., FIZAMES, C., SAMSON, D., DROUOT, N., et al. (1995). A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*. Vol.(380): 152-154.
- ELLEGREN, H. (2000). Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics*. Vol.(16): 551-558.
- FERÁK, V., SRŠEŇ, Š. (1990). *Genetika človeka*. Slovenské pedagogické nakladateľstvo, 447, ISBN 80-08-00349-9.
- FLAQUER, A., RAPPOLD, G.A., WIENKER T.F., FISCHER, Ch. (2008). The human pseudoautosomal regions: a review for genetic epidemiologists. *European Journal of Human Genetics*. Vol.(16): 771-779.
- GRIFFITHS-JONES, S., MOXON, S., MARSHALL, M., KHANNA, A., EDDY, S., BATEMAN, A. (2005). Rfam: annotating non-coding RNAs in complete genomes. *Nucleic Acids Research*. Vol.(33): D121–D124.
- HAMILTON, M.B. (2009). *Population Genetics*. Wiley–Blackwell, 396, ISBN 978-1-4051-3277-0.
- JURKA, J., PETHIYAGODA, Ch. (1995). Simple Repetitive DNA Sequences from Primates: Compilation and Analysis. *J. Mol. Evol.* Vol.(40): 120-126.
- KADÁŠI, E. (2010). *Genetika človeka*. Vydavateľstvo Univerzity Komenského v Bratislave, 112, ISBN 978-80-223-2849-4.
- LEVINSON, L., GUTMAN, G.A. (1987). Slipped-Strand Mispairing: A Major Mechanism for DNA Sequence Evolution. *Mol. Biol. Evol.* Vol.(3): 203-221.
- MATSUDA, Y., HIROBE, T., CHAPMAN, V.M.(1991). Genetic basis of X-Y chromosome dissociation and male sterility in interspecific hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*. Vol.(88): 4850-4854.
- ROSS, M.T., GRAFHAM, D.V., COFFEY, A.J., SCHERER, S., MCLAY, K., MUZNY, D., et al (2005). The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*. Vol.(7031): 325-337.
- SNUSTAD, D.P., SIMMONS, J.M. (2009). *Genetika*. Masarykova univerzita- Nakladatelství, 871, ISBN 978-80-210-4852-2.
- SUTHERLAND, G.R., RICHARDS, R.I. (1995). Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*. Vol.(9): 3636-3641.
- SZIBOR, R., KRAWCZAK, M., HERING, S., EDELMANN, J., KUHLISCH, E., KRAUSE, D. (2003). Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int. J. Legal. Med.* Vol.(117): 67-74.
- SZIBOR, R., HERING, S., KUHLISCH, E., PLATE, I., DEMBERGER, S., KRAWCZAK, M., EDELMANN, J. (2005). Haplotyping of STR cluster DXS6801–DXS6809–DXS6789 on Xq21 provides a powerful tool for kinship testing. *Int. J. Legal. Med.* Vol.(119): 363-369.
- SZIBOR, R. (2007). X-chromosomal markers: Past, present and future. *FCI*. Vol.(1): 93-99.
- VEERAPPA, A.M., PADAKANNAYA, P., RAMACHANDRA, N.B. (2013). Copy number variation-based polymorphism in a new pseudoautosomal region 3 (PAR3) of a human X-chromosome-transposed region (XTR) in the Y chromosome. *Funct. Integr. Genomics*. Vol.(13): 285-293.

Key words: DNA analysis, paternity testing, X chromosome, X-STR, kinship analysis.

Summary

Idea of usage of X-chromosomal markers in forensic practice originates from clinical genetics. The main application of X-STR markers is in kinship testing. Ordinary cases do not require usage of these markers, however they can be, under certain circumstances very useful. X-STRs are also used in population studies and stain analysis. This paper will focus not only on STRs alone, but also on special features of chromosome X, as they are key elements of proper usage of these markers.

*kpt. RNDr. Barbara Sviežená, PhD.
Oddelenie kriminalistickej biológie
a genetickej analýzy
Kriminalistického a expertízneho ústavu PZ
Bratislava
e-mail: barbara.sviezena@minv.sk, kl. 57324;*

*mjr. Mgr. Andrej Choma, PhD.
Oddelenie kriminalistickej biológie
a genetickej analýzy
Kriminalistického a expertízneho ústavu PZ
Bratislava
e-mail: andrej.choma@minv.sk, kl. 57324;*

*Nikola Ďuríková
Katedra genetiky Prírodovedeckej fakulty UK,
Bratislava*

Recenzenti: Ing. Eduard Sivčo, RNDr. Regina Sepšiová, PhD.