

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra Antropologie a genetiky člověka**  
Studijní program: Biologie



Eva Kotrčová

## **Polymorfismus STR lokusů na X chromozomu a jejich využití ve forenzní genetice**

Polymorphism of STR loci on the X chromosome and its usage in forensic genetics

Školitel: RNDr. Pavel Čapek

Praha 2011

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne:

Podpis:

**Poděkování:**

Děkuji svému školiteli za pomoc a trpělivost a za možnost vyzkoušet si některé metody „naživo“.

## Abstrakt

Identifikace osob a příbuznosti, pomocí STR (short tandem repeat) lokusů, patří v současné době k rutinně užívaným metodám a to nejen ve forenzní praxi. Běžně jsou analyzovány STR na autozomech a velmi populární je i Y chromozom, který má, bez možnosti rekombinace, velký význam především v genealogii. Chromozom X byl dosud v tomto ohledu využíván nejméně, přestože je ve specifických případech popisnější než autozomální lokusy.

Cílem této práce je poskytnout základní přehled o X STR a o metodách běžně používaných k analýze mikrosatelitů s důrazem na jejich specifické chování, pokud jsou lokalizovány na X chromozomu a následných možnostech využití těchto specifit zejména ve forenzní genetice.

## Klíčová slova

STR polymorfismus • X chromozom • forenzní genetika • testy příbuznosti

## Abstract

Personal or kinship identification by STR (short tandem repeat) loci is currently a routinely used method, not only in forensic practise. Autosomal STRs are usually analyzed, Y chromosome also being popular because of his great importance (especially in genealogy) due to his recombination incapability. The X chromosome has been used least frequently in these respect, even though in specific cases, it might be more descriptive than autosomal loci.

The purpose of this work is to provide a basic overview of the STR sequences and methods that are commonly used to analyze microsatellites, with emphasis on their specific behavior (if located on the X chromosome) and the subsequent possibilities of using these specificities especially in forensic genetics.

## Key words

STR polymorphism • X chromosome • forensic genetics • kinship testing

## Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>2. FORENZNÍ GENETIKA</b> .....	<b>7</b>
2.1. Historie.....	7
2.2. Repetitivní sekvence .....	8
2.4. Typy STR.....	8
2.5. Výhody STR .....	9
<b>3. METODIKY VYUŽÍVANÉ VE FORENZNÍ GENETICE</b> .....	<b>9</b>
3.1. Extrakce DNA.....	9
3.3. Amplifikace - PCR (Polymerase chain reaction).....	12
3.4. Elektroforéza.....	14
3.5. Možné problémy při vyhodnocování vzorku.....	15
<b>4. X CHROMOZOM</b> .....	<b>16</b>
4.1. Dědičnost X chromozomu .....	16
4.2. Párování s Y chromozomem.....	16
4.3. Vývoj X chromozomu .....	17
4.4. Inaktivace X chromozomu.....	17
4.5. Genový obsah X chromozomu .....	18
4.6. Patologie spojené s X chromozomem, Syndrom fragilního X (FRAXA) .....	19
<b>5. POLYMORFISMUS STR LOKUSŮ NA X CHROMOZOMU</b> .....	<b>19</b>
5.1. Nomenklatura.....	19
5.2. Vazebné skupiny na X chromozomu .....	20
5.3. Testy příbuznosti.....	22
5.4. Forezní praxe .....	22
5.6. Lékařská diagnostika .....	25
5.7. STR a identifikace zvířat .....	25
<b>6. POROVNÁNÍ FREKVENČÍ ALEL V RŮZNÝCH POPULACÍCH</b> .....	<b>26</b>
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	<b>28</b>
<b>8. SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>29</b>
<b>9. POUŽITÉ ZDROJE</b> .....	<b>30</b>
9.1. Literatura.....	30
9.2. Internetové zdroje .....	37

# 1. Úvod

DNA obsahuje oblasti, které jsou pro každého jedince unikátní stejně jako otisky prstů a proto může být využita k identifikaci jedinců a určování vztahů mezi nimi (*Jeffreys, Wilson, Thein, 1985*), a proto může.

Individuální a skupinová identifikace osob je hlavní doménou forenzní genetiky. V počátcích se pro forenzní analýzu využívaly minisatelity, o velikosti 9 – 100 bp, postupně je ale nahradily mikrosatelity, tedy STR o délce 2 – 6 bp. Podstatnou výhodou analýzy STR je rychlost, s jakou je možné zpracovat, větší množství lokusů současně a dále velká přesnost a menší nároky na objem vzorku, který má být analyzován. Při řešení složitějších případů se ukázalo výhodné nespoléhat pouze na autozomy a využít k testování i genetickou informaci uloženou v jiných oblastech genomu. Pro paternální linii Y chromozom, který se udržuje beze změn a pouze výjimečně dochází k mezigeneračním mutacím. Obdobou Y chromozomu pro maternální linii jsou hypervariabilní úseky mitochondriálního genomu. Chromozom X zůstával stranou zájmu, kvůli svému specifickému chování, kdy se u samic savců chová jako autozom a u samců jako gonozom s absencí rekombinace (*Pereira, et al., 2007*). V posledních několika letech značně stoupl počet publikací věnující se tomuto tématu. Ukazuje se, že chromozom X může být velmi užitečný při analýze komplikovaných příbuzenských vztahů či jako doplňující marker při identifikaci jednotlivců.

V úvodu práce se zaměřuji na vymezení forenzní genetiky a obecných vlastností tandemových repetitivních sekvencí. Následující kapitola poskytuje přehled metod, které jsou v současné době využívány forenzní genetikou a poslední tři kapitoly shrnují fakta o X chromozomu jako takovém a o polymorfismu lokusů na něm ležících.

## 2. Forezní genetik

Forezní genetiku je možné rozčlenit do tří hlavních odvětví. Prvním je kriminalistická genetik, která zkoumá především stopy ponechané na místě trestného činu s cílem spojit je s pachatelem. Druhým je genetik identifičn, sem spadá například určování identity neznámých osob při hromadných neštěstích a třetím odvětvím je genetik kognitivní, která se zabývá příbuzenskými vztahy. Dál sem patří i studování non-humánní DNA a to nejen zvířecí, ale i rostlinné, případně bakteriální (<http://www.cssfg.org/cz/1111/co-je-forezní-genetika/>).

Oproti lékařské genetice se forezní genetik zabývá nekódujícími oblastmi genomu, které jsou mnohem polymorfnější než oblasti kódující (<http://www.cssfg.org/cz/1113/metody-forezní-genetiky/>). Vybírají se takové lokusy, které jsou v populaci co nejvariabilnější a tedy i nejpopsnější, ale musí být i stabilní, aby se konkrétní alely v různých tělních tkáních nelišily (*Schneider, 2007*).

### 2.1. Historie

Před rozvojem analýz DNA byly k identifikacím využívány například imunologické metody, čili určení krevních skupin, nebo metody mikroskopické, jako je porovnávání trichologického materiálu. Nejefektivnější se však ukázalo testování nekódujících repetitivních oblastí.

Prvním kdo objevil repetitivní sekvence byl anglický genetik Alec Jeffreys, všiml si, opakujícího se vzorce a také zjistil, že se počet opakování mezi jednotlivými lidmi liší. Kromě toho také vymyslel způsob, jak jednotlivé sekvence porovnávat (pracoval s VNTR). Používal metodu známou pod zkratkou RFLP (restriction fragment length polymorphism), při které byly k určení vzorce produktů RFLP používány restriční endonukleázy (*Jeffreys, Wilson, Thein, 1985*).

Pro další rozvoj forezní genetik mělo zásadní význam zdokonalení technologií, zejména PCR (polymerase chain reaction). Metoda PCR totiž značně urychlila analýzu a umožnila amplifikaci několika úseků najednou. Na přelomu 20. a 21. století ve forezní genetice převládlo využívání STR lokusů.

Od roku 2006 je dostupný komerční kit (tj. sada obsahující chemikálie potřebné pro amplifikaci a detekci vzorků) analyzující osm lokusů na X chromozomu (*Hedman, Palo, Sajantila, 2009*), v současnosti je již možné testování až dvanácti lokusů v jedné reakci.

## 2.2. Repetitivní sekvence

Repetitivní sekvence se nachází napříč celou DNA a jejich délka může dosahovat až tisíců bází. Nejdelší z nich se nazývají satelity, obvykle jsou lokalizovány v heterochromatinu, většinou v oblasti centromer.

Kratší jsou minisatelity nebo též VNTR (variable number of tandem repeat), s délkou repetice 9 – 100 bází. V genomu jsou více rozprostřené, ale najdeme je především v okolí telomer.

Mikrosatelity, STRs (short tandem repeats), případně SSRs (simple sequence repeats), mají opakující se motiv dlouhý 2 – 6 bází, jsou roztroušené napříč celým genomem, často i v kódujících oblastech (*Pena, et al., 1993*). Jednotlivé lokusy jsou silně polymorfní, proto se ukázaly být velmi užitečné při identifikaci osob. Mikrosatelity zauímají až 3% lidského genomu, v lidském genomu je jich víc než milion (*Chen, et al., 2009*) a na chromozomu X je můžeme najít po každých 300 – 500 bp (*Alford, et al., 1994*).

## 2.3. Polymorfismus a jeho typy

Polymorfismus čili variabilita, je existence více než jedné alely v populaci, ať už se jedná o alelu kódující sekvence ( genu), nebo nepřepisované oblasti. Obecně známe dva druhy polymorfismu, buď je to polymorfismus sekvenční, který vzniká substitučními záměnami, pak se jedná o rozdílnost v pořadí nukleotidů. Druhým typem je polymorfismus délkový, což je právě případ STR, ten vzniká zejména při inzercích, duplikacích, případně delecích. Tento typ je charakterizován různým počtem opakování určitého motivu (úseku DNA).

Odlišnou formu alely považujeme za polymorfismus, pokud její výskyt v populaci přesahuje 1%, pokud je frekvence jejího výskytu nižší, jde o mutaci.

## 2.4. Typy STR

Podle počtu nukleotidů, které se opakují v řadě za sebou, rozlišujeme repetice dinukleotidové, trinukleotidové, tetranukleotidové, pentanukleotidové nebo hexanukleotidové. Při genetických analýzách jsou nejvyužívanějším typem tetranukleotidy. Při práci s nimi se totiž omezuje na minimum množství artefaktů, způsobených zejména prokluzováním polymerázy, navíc penta- a hexanukleotidy jsou v populaci méně časté (*Lygo, et al., 1994*). Další typ dělení STR vyčleňuje tyto skupiny: jednoduché repetice, ty obsahují jednotky o stejné délce a sekvenci, složené repetice



sestávají ze dvou nebo více sousedících jednoduchých repetic a komplexní repetice, které jsou tvořeny několika bloky o variabilní délce (*Urquhart, et al., 1994*). Poslední jmenované nejsou příliš využívány, práce s nimi je obtížná kvůli jejich nesnadnému rozlišení. Posledním specifickým typem jsou mikrovarianty, což jsou alely, které obsahují nekompletní repetici. Vznikají především vlivem delecí, inzercí případně nukleotidových záměn. Problém s jejich vyhodnocováním je, že nemají mezi standardy žádnou odpovídající alelu. Taková alela se pak určuje podle relativní blízkosti k ostatním, nám známým alelám (*Crouse, et al. 1999*). Častěji se vyskytují u heterozygotů, kde je pak jedna alela „normální“ a druhá mikrovariantní.

## 2.5. Výhody STR

Minisatelity jsou sice vysoce polymorfni, ale jejich zpracování vyžaduje velké množství DNA vysoké kvality a využití techniky „Southern blotting“. Ve výsledku je tedy práce s nimi oproti mikrosatelitům výrazně časově náročnější. Analýza STR lokusů je rychlá, velmi přesná a k obdržení výsledků stačí malé množství DNA. Díky jejich krátké délce je možné využít i částečně degradovanou DNA a multiplexní PCR. Dalším kladem testování STR je možnost automatizace většiny procesů (viz. kapitola 3.) (*Alford, et al., 1994*). Schopnost identifikace jednotlivých STR závisí na jejich polymorfismu v populaci a na tom, kolik je jich najednou testováno.

# 3. Metodiky využívané ve forenzní genetice

## 3.1. Extrakce DNA

Při izolování DNA z biologického materiálu nesmí dojít k degradaci a musí se odstranit inhibitory PCR a kontaminační látky (hemoglobin, indigo z džínoviny, nečistoty z prostředí...) (*Larkin, Harbison, 1997*). Degradace probíhá po smrti buňky, kdy je DNA rozkládána nukleázami, významné jsou i okolní podmínky jako vlhkost, teplo, ale i bakterie nebo houby. Inhibitory se naváží do aktivního místa polymerázy, která pak nemůže správně fungovat. Je třeba zabránit i UV záření, vlivem něhož se na DNA vytváří tymidinové dimery, které zabraňují pohybu polymerázy po vláknu DNA. Inhibitory mohou působit jak na funkci polymerázy tak na samotnou lýzi buňky. Odstranit je lze několika způsoby, buď naředit vzorek a s ním i inhibitor, nebo přidáním různých látek jako jsou albumin nebo betadin, případně přečištěním přes membránu.

Nejvyužívanější metody pro izolaci DNA jsou izolace pomocí chelexu, FTA karet, nebo adsorpcí na křemičité partikule/křemičitou membránu. Dříve hojně využívanou byla i fenol-chloroformová extrakce, od které se dnes upouští.

Každá z těchto metod má své výhody a nevýhody, nelze říct, která z nich je nejlepší. Volba se musí řídit konkrétními podmínkami – zejména stavem vzorku a množstvím DNA.

### **Fenol-chloroformová extrakce**

Ke vzorku se přidá SDS (dodecylsírán sodný) a proteináza K, EDTA (kyselina ethyldiamintetraoctová) a DTT (dithiothreitol), tyto látky rozbijí buněčné membrány a proteiny chránící DNA, následně se přidá směs fenolu a chloroformu, která oddělí proteiny od DNA. Při centrifugaci pak klesnou proteiny ke dnu zkumavky, zatímco DNA zůstává ve vodné fázi, odkud se odebírá. Následně se DNA zkoncentruje alkoholovou precipitací.

Pro dokonalé odstranění proteinů je třeba proces opakovat, což znamená velké riziko kontaminace během přenosu mezi zkumavkami.

Upravenou verzí tohoto postupu je diferenciální extrakce, která se používá k oddělení epiteliálních a spermatických buněk. Ke vzorku se nejdříve přidá směs látek bez DTT, což stačí k „rozbití“ epiteliálních buněk, po centrifugaci se odebere uvolněná DNA a teprve potom je přidána směs obsahující DTT, která rozruší i buňky spermatické ze kterých se uvolní DNA (*Köchl, Niederstätter, Parson, 2005*).

### **Izolace chelexem**

Princip této metody využívá funkce chelatačních činidel, tj. látek, které vyvazují kovové ionty. V tomto případě jsou vyvazovány hořečnaté ionty, které jsou nezbytné k fungování nukleáz. Bez hořčíku nefungují nukleázy a DNA není rozkládána. V prvním kroku jsou vzorky promyty, aby se odstranili případné inhibitory PCR (např. hem), pak jsou přidány do 5% roztoku chelexu a teplota je zvýšena na bod varu. Varem denaturují proteiny a DNA je uvolněna z buňky. Nakonec se vzorky centrifugují, ssDNA je přítomna v supernatantu a může být odebrána k dalším krokům analýzy. Tento postup se ukázal být účinnější než fenol-chloroformová extrakce, navíc je postup poměrně nenáročný, což s sebou nese menší riziko kontaminace (*Walsh, Metzger, Hiquchi, 1991*).

## **FTA karty**

FTA karta je absorpční papír na bázi celulózy, který je napuštěn směsí chemikálií, která zlyzuje buňky a denaturuje proteiny, navíc předchází bakteriálním kontaminacím a chrání před UV zářením (*Borman, Fraser, 2010*). DNA je stabilizovaná a na tomto médiu při pokojové teplotě vydrží i několik let. Při izolaci se na něj kápne krev, která se nechá zaschnout, buňky lyzují a DNA je imobilizovaná. Pro následné namnožení DNA stačí vložit výsek karty přímo do PCR reakční směsi. Velkou výhodou je, že vzorky nepotřebují žádné zvláštní podmínky pro skladování a zabírají málo místa. V mnoha zemích jsou FTA karty využívány k odběru a skladování bukových stěrů (de *Vargas Wolfgramm, et al. 2009*).

## **Adsorpce na křemenné partikule/křemennou membránu**

V dnešní době je adsorpce na křemenné partikule příp. křemennou membránu tou nejvyužívanější metodou extrakce DNA ve forezních laboratořích, protože jde o rychlou a citlivou metodu. DNA se v pufru o vysoké koncentraci solí naváže na membránu/partikule, nečistoty jsou odmyty a následně je DNA vymyta pufrům s nižší koncentrací solí, případně vodou (<http://www.qiagen.com/products/dnacleanup/gelpcrsicleanupsystems/qiaquick96pcrpurificationkit.aspx#Tabs=t1>).

Existuje řada dalších postupů, které byly úspěšně odzkoušeny, čtyři výše uvedené, patří mezi nejčastěji využívané.

## **3.2. Kvantifikace**

Kvantifikace čili určení výchozího množství DNA je velmi důležitý krok při zpracování forezních vzorků. Znalost množství templátové DNA umožňuje správné nastavení PCR reakce a dosažení optimálních výsledků (*Nielsen, et al., 2008*).

Obecně se často využívají metody jako je Slot blot/dot blot kvantifikace s nanášením vzorku na nylonovou membránu (*Walsh, Varlao, Reynold, 1992*), Aluquant human DNA quantitation system využívající luciferin (*Mandrekar, et al., 2001*) nebo PicoGreen microtiter plate assay s dsDNA specifickou barvou (*Singer, et al., 1997*). Ovšem pro forezní genetiku, která běžně pracuje s množstvími DNA, která se pohybují v řádech pikogramů, jsou tyto metody málo citlivé a rutinně užívanou metodou je prakticky jen real time PCR.

## Real time PCR

Na rozdíl od klasického PCR (viz. podkapitola 3.3) je tato metoda obohacena o možnost průběžného sledování narůstání množství kopií templátu během jednotlivých cyklů. Je nutná přítomnost fluorescenčních sond, které se váží na syntetizovanou DNA. Úroveň záření pak odpovídá množství nasyntetizované DNA (*Heid, et al., 1996*). Používají se různé typy sond. Jedním typem jsou nespecifické, které se váží na jakoukoli dvouvláknovou DNA, zástupcem této skupiny je barva SYBR-Green. Nespecifické značení je levnější, ale protože se váže na každou dvouvláknovou DNA, může poskytovat nepřesné výsledky, vlivem kontaminací (<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/absolute-vs-relative-quantitation.html?ICID=EDI-Lrn3>).

Specifické sondy se váží do určitého místa, musí být tedy designovány tak, aby byly komplementární, což zvyšuje jejich cenu. Specifické sondy mohou být hydrolyzační, pak nesou na svém konci fluorescenční barvivo = fluorofor a „zhášec“, který pokud se nalézá v blízkosti fluoroforu pohlcuje jeho emitované záření. Jakmile na vlákno nasedne Taq polymeráza postupně sondu odchlipuje od DNA, až se rozlomí, fluorofor se vzdálí od zhášec a je zaznamenán nárůst fluorescence (*Wittwer, et al., 2001*). Příkladem může být sonda typu Taq Man. Dalším typem jsou sondy hybridizační. Pak se využívají dva oligonukleotidy, které se váží na DNA těsně vedle sebe a mezi donorovou a akceptorovou barvou dochází k přenosu energie a vyzáření světla. Jakmile jsou od sebe oligonukleotidy odděleny, nedochází k přenosu a donorová barva vyzáří světlo o jiné vlnové délce (*van der Velden, et al., 2003*). Ke kitům jsou nyní přidávány vnitřní pozitivní kontroly, které odhalí případné chyby v postupu, nebo přítomnost inhibitorů polymerázy ve vzorku DNA.

### 3.3. Amplifikace - PCR (Polymerase chain reaction)

Při amplifikaci dochází ke zmnožení sledovaných úseků DNA, což je zejména v kriminalistice, kde mohou být nalézána jen nepatrná množství biologického materiálu, zcela zásadní. Její výhodou je rychlost a stačí jen malý objem vzorku i ne příliš vysoké kvality. Ovšem i PCR má své hranice, příliš malé množství DNA může vést k nepřesnostem při vyhodnocování (viz. podkapitola 3.5.). Podmínkou proběhnutí reakce je znalost okolní sekvence úseků, které chceme namnožit, aby mohly být připraveny odpovídající primery (*Zietkiewitsz, Rafalski, Labuda, 1994*).

PCR sestává z více než třiceti cyklů, přičemž každý cyklus obsahuje tři dílčí kroky. Nejdříve jsou vzorky zahřáté na teplotu 92-96 °C, čímž se DNA denaturuje, následně dochází k navázání primerů na cílové sekvence (při teplotě 45-65 °C) a nakonec jsou nukleotidové řetězce prodlužovány působením polymerázy (při teplotě 72 °C). PCR reakce obsahuje templátovou DNA, tedy vzorek který chceme namnožit, 2 primery, deoxytrinukleotidy (dNTP), DNA polymerázu a pufr s obsahem hořčičných iontů, které jsou nezbytné pro funkci polymerázy.

Metoda PCR je široce využívána (kriminalistika, lékařská diagnostika, genové inženýrství, molekulární fylogenetika...), aby co nejlépe splňovala potřeby jednotlivých aplikací, dočkala se mnoha modifikací. Ve forenzní genetice se běžně užívá hot start PCR, kdy k aktivaci polymerázy dochází po zvýšení teploty (*Paul, Shum, Le, 2010*). Dalšími modifikacemi jsou real time PCR (viz. podkapitola 3.2.) a multiplex PCR, i u těchto postupů se používá hot start polymeráza.

### **Multiplexní PCR**

Pokud je v jedné PCR najednou namnoženo více cílových produktů, hovoříme o multiplexní PCR. Nejproblematictější je zvolit vhodné primery, musí totiž mít stejnou teplotu tání, být specifické k cílovým sekvencím, ale nesmí párovat mezi sebou. Navíc sekvence, ke kterým primery nasedají, musí být konzervativní, aby mutace nezabránilly navázání primeru k DNA. Designování primerů provádí počítačové softwary (*Henegariu, et al., 1997*).

Zároveň s PCR proběhne i značení vzorků, které se provádí pomocí fluorescenčních barviv, které jsou připojené k jednotlivým primerům. Takto značené primery jsou dražší (*Schuelke, 2000*), ale při multiplexní PCR nelze použít značení jednotlivých dNTPs, protože by od sebe nebylo možné rozlišit alely jednotlivých lokusů.

Ve zmiňované výhodě, že k provedení PCR stačí jen malé množství DNA, se skrývá i nevýhoda – velmi snadno se projeví jakákoli kontaminace. Ke kontaminaci může dojít mezi jednotlivými vzorky, od laboratorního pracovníka, z předchozí PCR a v případě kriminálních činů je možná kontaminace z místa činu. Kontaminaci z prostředí ovlivnit nelze, ale v dalších případech je prevencí práce v rukavicích, pláštích a s rouškami, čištění pracovních ploch pomocí UV, jednorázový materiál (zkumavky) a oddělený prostor pro vzorky před a po PCR. Kromě samotného vzorku je prováděna i PCR standardů, neboli kontrol, pro prověření optimálnosti podmínek, za kterých reakce

probíhá a správného laboratorního postupu. Negativní kontrola zaručuje, že žádná ze složek nebyla v průběhu analýzy kontaminována jinou DNA. Ve směsi pro reakci je templátová DNA nahrazena vodou nebo pufrem, takže pokud nedojde ke kontaminaci v průběhu PCR, nebude detekován žádný amplifikační produkt. Pozitivní kontrola ověří přítomnost a správného fungování všech složek (jako templát se používá dobře zachovaná DNA o známé sekvenci). Pro vyloučení kontaminace pracovníky laboratoře jsou genetické profily všech, kteří mohou přijít se vzorky do styku, k dispozici pro porovnání (*Lygo, et al., 1994*).

### 3.4. Elektroforéza

Elektroforetické metody slouží k rozlišení alel podle jejich velikosti. Provádí se buď kapilární elektroforéza, nebo elektroforéza na gelu. Základním principem fungování elektroforézy je pohyb záporně nabitá DNA v elektrickém poli ve směru od záporného ke kladnému náboji. Tento záporný náboj udílí DNA její fosfátové skupiny.

Gelová elektroforéza probíhá na plátku agarózového nebo polyakrylamidového gelu, přičemž elektroforéza na agaru slouží k rozlišení větších molekul, minimem je 500 bází (*Voytas, 2001*), polyakrylamidový gel má schopnost rozlišit menší molekuly, do 10 bp (*Maniatis, Jeffrey, van deSade, 1975*).

#### **Kapilární elektroforéza**

Tenká kapilára (v průměru 50-100  $\mu\text{m}$ ) je naplněna viskózním polymerem, který vede proud. Oba konce kapiláry jsou ponořené do nádob s pufrem, společně s elektrodami. Před zahájením práce se kapilára ponoří do vzorku, do jejího konce vnikne malé množství kapaliny, a pak je ponořena zpátky do pufru. Při průchodu elektrického proudu se vzorky v kapiláře pohybují, obdobně jako u gelové elektroforézy. V určitém místě kapilára prochází detektorem, který zaznamenává fluorescenci. Při průchodu značeného PCR produktu se změní signál z detektoru, který počítač vyhodnotí jako pík. Celý tento proces je automatizován. Do každého vzorku je přidáván vnitřní standard (size standard) se známými délkami fragmentů. Spolu s testovanými vzorky se musí vyhodnocovat i známý vzorek, tzv. alelický žebřík (allelic ladder), jedná se o směs známých alel, které se využívají při identifikaci alel neznámých (*Fujii, et al., 2004*).

Tato metoda je mnohem rychlejší a přesnější, výsledky jsou rovnou zpracovávány počítačem. Nevýhoda spočívá v její vyšší ceně (*Drossman, et al. 1990*).

Vyhodnocování výsledků elektroforézy se provádí na základě intenzity fluorescenčního signálu a okamžiku projití detektorem v případě kapilární elektroforézy, v případě gelové podle polohy proužku na gelu.

### 3.5. Možné problémy při vyhodnocování vzorku

#### **Stutter efekt**

Stutter pík je definován jako produkt o jednu repetici kratší než je alela, se kterou je asociován. Jeho vznik je způsoben sklouznutím polymerázy (*Gill, Sparkes, Kimpton, 1997*). Rozlišování stutter píku od normálního může být problematické zejména u smíšených vzorků, v úvahu se bere procentuální výskyt stutterů (*Chen, et al., 2008*). Ten je pro každý lokus jiný, ale obecně je jejich nejmenší výskyt u tetranukleotidů, proto jsou také využívány nejvíc.

#### **Netemplátová adice**

Taq polymeráza často na konec produktu přidá báze nezávisle na templátu, nejčastěji to bývá adenosin. Tím vznikne produkt o něco delší než ostatní. Je žádoucí, aby byly produkty sjednocené buď ve formě A+ nebo A- (tedy bez netemplátového prodloužení), aby počítač vyhodnotil výsledky správně (*Brownstein, Carpten, Smith, 1996*). Pro získání všech produktů v neprodloužené formě se například používá speciální polymeráza, nebo se přebývající báze odstraní enzymaticky. Většinou je preferováno převedení všech produktů na A+ pomocí prodloužení posledního cyklu PCR (*Kondo, et al., 2000*).

#### **„Allele drop out“, „null allele“**

K alelickému drop outu dochází především při analyzování malého množství DNA. Jedna náhodná alela není amplifikována a to vede ve výsledku k falešnému určení homozygota, ač je správně profil heterozygotní (*Alonso, et al., 2003*). Pravděpodobnost výskytu tohoto jevu je téměř nulová u dobře zachovaných vzorků v dostatečném množství (*Tvedebrink, et al., 2009*).

K jevu známému jako „null allele“ dojde, pokud je v oblasti primeru přítomná nějaká mutace, primer tedy nenasedne a alela se nenamnoží. Ve výsledku se může projevit stejně jako „drop out“. Četnost „null allele“ se na úrovni populačních dat počítá na základě menší frekvence heterozygotů, než by odpovídalo Hardy-Weinbergově rovnováze (*van Oosterhout, et al., 2004*).

## 4. X chromozom

Chromozom X je gonozomem, čili chromozomem pohlavním. U člověka obsahuje 155Mbp a kóduje 1669 genů (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=X>). Společně se svým protějškem, chromozomem Y, tvoří 23. pár lidských chromozomů, který na rozdíl od zbývajících 22 párů není homologní.

Chromozom Y je velký pouze 59 Mbp a kóduje 426 genů (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=Y>).

Liší se tedy nejen velikostí, ale i obsahem genů a morfologií.

### 4.1. Dědičnost X chromozomu

Pro způsob přenosu chromozomu X do další generace je zcela zásadní fakt, že se vyskytuje nerovnoměrně u obou pohlaví. Zatímco u žen jsou v páru dva chromozomy X, u mužů je pouze jeden, který páruje s Y chromozomem. Tento stav, kdy k sobě chromozom nemá homologní protějšek, se označuje jako hemizygotní. Žena proto vždy se stejnou pravděpodobností předá svým potomkům jeden z X chromozomů, muž předá svým dcerám X chromozom vždy, synům nikdy. Toto schéma, bylo vypořádáno v 18. století na základě přenosů různých druhů hemofilií (*Ross, et al., 2005*).

Význam těchto principů je uveden u jednotlivých podkapitol (viz. podkapitoly 4.4., 4.5., 5.3.).

### 4.2. Párování s Y chromozomem

Vzhledem k rozdílnosti pohlavních chromozomů se vyvinuly mechanismy, které tyto odlišnosti kompenzují. Problém nastává už v meióze, kdy spolu nemohou párovat celou svou délkou jako ostatní chromozomy. K párování dochází pouze ve dvou tzv. pseudoautozomálních oblastech, které jsou tedy jedinými úseky, ve kterých může dojít k rekombinaci. PAR 1 se nachází na koncích krátkého raménka chromozomů, obsahuje 24 genů a přes 2,6 Mbp (*Ross, et al., 2005*), PAR 2 na konci dlouhého raménka je velká pouze 320 kb a na rozdíl od PAR 1 zde dochází k rekombinaci jen výjimečně. Pro správný průběh meiózy čili i pro zajištění plodnosti je limitující párování v oblasti PAR1, PAR2 není nezbytně nutná (*Charchar, et al., 2003*). Chyba v párování znamená nesprávnou orientaci na dělicím vřetenku, což v důsledku vede k aneuploidii či polyploidii jako je Turnerův nebo Klinefelterův syndrom. Ačkoli jsou



pseudoautozomální oblasti ve srovnání se spojením autozomů malé, selže jejich propojení jen málo kdy. (*Kauppi, et al., 2011*).

### 4.3. Vývoj X chromozomu

Pohlavní chromozomy se vyvinuly z páru autozomů. Kromě pseudoautosomálních oblastí zůstalo gonozomům jen velmi málo shodných oblastí. Rozdílnost mezi chromozomy, se měří na základě míry odlišnosti sekvence DNA, na kterých je stále patrná homologie. Na X chromozomu jsou soustředěny především na krátkém raménku. Čím delší je doba, po kterou v jednotlivých oblastech nedocházelo k rekombinaci, tím odlišnější sekvence bude. Podle této metody se usuzuje, že vývoj proběhl ve čtyřech základních krocích, přičemž po každé změně přestalo docházet k rekombinaci v dané oblasti. K prvním změnám, které vyústily v jejich současnou podobu, došlo pravděpodobně kolem oddělení savčí a ptačí linie (*Lahn, Page, 1999*), před 350 miliony let (*Rosser, Balesque, Jobling, 2009*). Tvrzení, že se pohlavní chromozomy vyvinuly z autozomů potvrzuje i fakt, že nejsou homologní s ptačími pohlavními chromozomy ZW. Chromozom X odpovídá ptačím chromozomům 1 a 4 (*Graves, Gécz, Hameister, 2002*).

### 4.4. Inaktivace X chromozomu

Kromě specifického párování přes pseudoautozomální oblasti je inaktivace náhodného X chromozomu samic placentálních savců dalším mechanismem, který kompenzuje rozdílnost mezi pohlavními chromozomy. Nepatrný genový obsah chromozomu Y by vedl k výrazné nerovnováze mezi pohlavími, čemuž předchází právě proces inaktivace, kdy je jeden z X chromozomů utlumen. Neaktivní chromozom je u lidí patrný ve světelném mikroskopu jako Barrovo tělísko.

Inaktivace probíhá v raném embryonálním vývoji a následně se přenáší do všech somatických buněk (*Deakin, et al., 2009*). Utlumen je náhodně vybraný chromozom, poté co je aktivován gen Xist (X-inactive specific transcript). Jeho produktem je RNA, která obalí X chromozom v poloze cis, tedy ten, z něhož byla RNA přepsána. Následují další modifikace, jako je metylace, které inaktivaci stabilizují (*Barakat, et al., 2011*).

Přesto inaktivace neznamena, že se odmlčí úplně všechny geny. U žen bylo pozorováno 15% genů z celkového genového obsahu na X, které inaktivaci unikají vždy, navíc u některých žen nebylo umlčeno dalších 10%. Patří sem několik genů, které mají homology na Y chromozomu, jinak by inaktivace postrádala svůj balanční

smysl, a některé další. Vliv těchto genů se dá dobře pozorovat na lidech s monosomií X – Turnerovým syndromem. Inaktivace má svůj význam i v těchto nefyziologických stavech, kdy zajišťuje životaschopnost jedince s polysomií nebo monosomií X, což je jediná monosomie, která je vitální. (*Park, Carrel, Makova, 2010*).

#### 4.5. Genový obsah X chromozomu

Chromozom X je obecně bohatý na geny související s určením pohlaví a reprodukci a nejedná se pouze o ženskou plodnost. Jedním z genů, ležících na X chromozomu zodpovídajícím za mužskou plodnost je například gen DAX 1 (*Vaiman, 2002*). Další geny ovlivňují inteligenci (bylo popsáno 202 mentálních retardací vázaných na X, přičemž 136 z nich je syndromatických) příkladem může být FMR1 (viz. podkapitola 4.6.), případně mají vliv na vývoj jedince, buněčnou signalizaci či intracelulární transport, jako je gen WAS zodpovědný za zprostředkování regulace aktinového cytoskeletu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/300392>). Kromě genů přepisovaných do formy proteinů, leží na X chromozomu i geny kódující regulační RNA (*Graves, Gécz, Hameister, 2002*).

I přes tyto velmi zásadní funkce obsahuje jen asi 4% lidského genomu a hustota jeho genů je velmi nízká. Tento jev má několik alternativních vysvětlení. Je možné, že byl nízký genový obsah už na původních autozomech, svou roli mohou hrát i již zmíněné regulační RNA a přítomnost velkých genů, včetně lidského největšího genu pro dystrofin (2,4 Mbp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1756>)) (*Ross, et al., 2005*).

Hemizygotní sestava u mužů má velký význam pro složení genů na X chromozomu, působí zde totiž mnohem větší selekční tlak, protože se projeví každá, i recesivní, alela. Neexistuje tedy muž, který by měl heterozygotní sestavu, tudíž, bude – li se jednat o chorobu, budou pouze muži zdraví nebo nemocní, nebudou žádní přenašeči. Negativní mutace je potom rychle z populace odstraněna a pozitivní se rozšíří. Toto neplatí pro ženy, které i přes inaktivaci stále mají cca 50% somatických buněk, ve kterých je funkční zdravá alela a projev recesivní je potlačen (*Puck, Willard, 1998*).

Tento selekční tlak ovšem není zaměřený pouze na mutace, předpokládá se, že stejným principem z X chromozomu vymizely tumorsupresorové a proonkogenní geny (případně na chromozomu zůstaly bez zmíněných funkcí), které by byly v hemizygotní sestavě pro svého nositele letální (*Graves, Gécz, Hameister, 2002*) a nejspíš byl X chromozom touto cestou ochuzen o některé geny, u kterých se ukázalo nezbytné být v páru (*Ross, et al., 2005*).

#### 4.6. Patologie spojené s X chromozomem, Syndrom fragilního X (FRAXA)

K chromozomu X se váže velké množství chorob, většinou se jedná o choroby recesivní, jako jsou kombinované imunodeficience, muskulární dystrofie atp. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>), na které je vyvíjen menší selekční tlak (viz podkapitola 1.4), příkladem dominantní choroby je incontinentia pigmenti (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/308300>).

Tandemové repetice a choroby vázané na X chromozom spojuje především syndrom fragilního X chromozomu. Je to nejběžnější dědičná mentální porucha s výskytem jednoho případu na 2000-6000 živě narozených (Cohen, et al., 2011). Je způsobena expanzí repetice CGG v genu FMR1 (fragile X mental retardation 1). Nemoc se projeví, pokud množství repetice přesáhne 200. Dědí se v podobě premutace, kdy se počet opakování pohybuje mezi 55-200, přenašečkou je většinou matka (Erickson, et al., 2011). Zmnožení tripletů způsobí metylaci CpG ostrůvků a následně dojde k inhibici exprese FMR1 genu. U zdravých jedinců se počet opakování pohybuje v rozmezí 3 – 55, kde jsou navíc vloženy AGG triplety (Renčiuk, Kypr, Vorlíčková, 2010).

Stejně jako u ostatních X-vázaných chorob jsou i zde projevy horší u mužů. Typicky se jedná o chování podobné autismu, problémy s vyjadřováním a pracovní pamětí, může se objevit agresivní nebo sebedestruktivní chování (Erickson, et al., 2011).

### 5. Polymorfismus STR lokusů na X chromozomu

STR lokusy na X chromozomu jsou dosud v porovnání s lokusy na ostatních chromozomech málo využívány. Výjimku tvoří chromozom Y, který sice není využíván do takové míry jako autozomy, ale přesto je používanější než X chromozom (Hedman, Palo, Sajantila, 2009). Uplatňují se zejména při identifikaci osob či příbuznosti, ale také v lékařské diagnostice (Hammond, et al., 1994).

#### 5.1. Nomenklatura

Jednotná nomenklatura lokusů je nezbytná pro vzájemné porozumění při předávání informací mezi jednotlivými laboratořemi, případně u soudních sporů (Urquhart, et al., 1994).

V případě názvu lokusů, jako je DXS... značí písmeno D, že se daná oblast nachází na DNA, X = na X chromozomu, S = single copy sequence a číslo, které následuje, říká, kolikátý byl daný lokus objeven a popsán na konkrétním chromozomu (*Butler, 2005*).

Název konkrétní repetice záleží na její struktuře a počtu opakování. Jako vlákno, z něž je repetice určována, se vybírá vlákno kódující. Pokud se jedná o STR, ležící mimo kódující oblast používá se název, který byl publikován, případně uložen do databáze jako první. Toto pravidlo platí, i pokud je pro jeden lokus používáno víc různých označení. Motiv se volí od 5' konce a je to první možný (*Bärr, et al., 1997*). V označení je dále ještě počet kompletních opakování a za tečkou je uveden počet nukleotidů v neúplné repetici, pokud se taková repetice vyskytuje (*Urquhart, et al., 1994*).

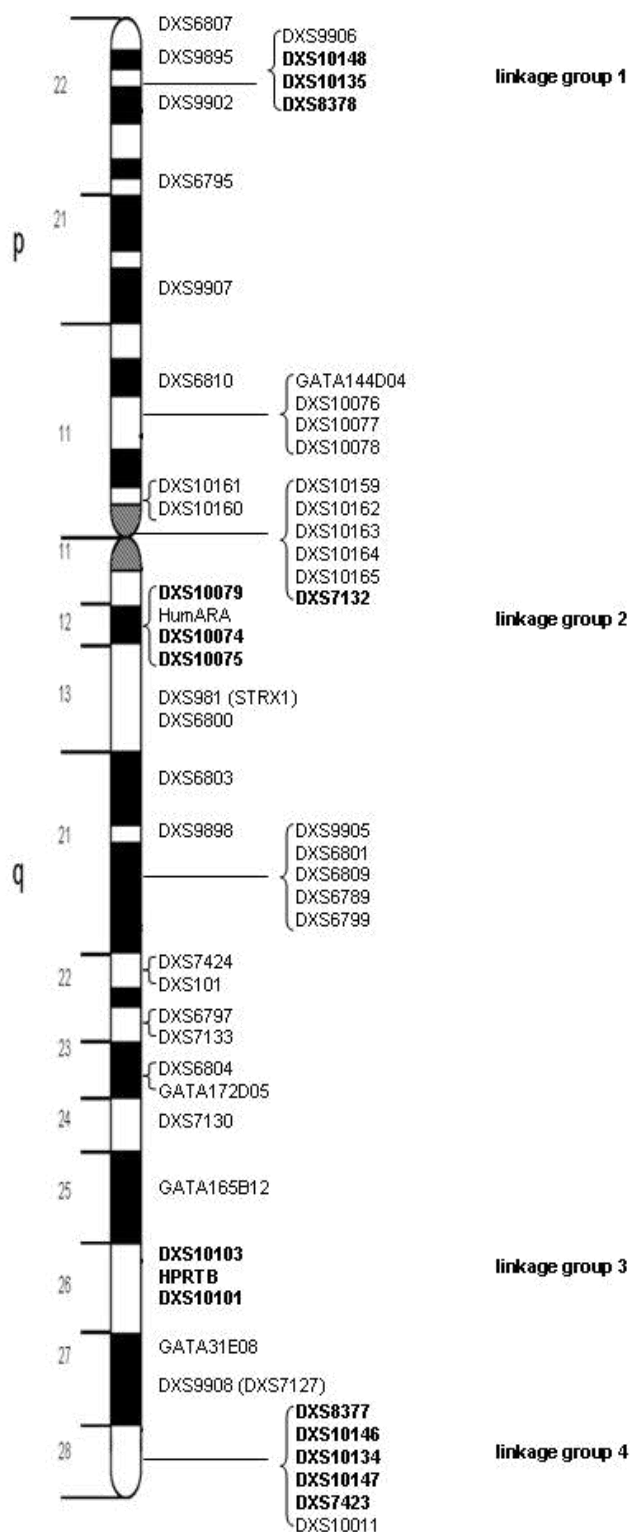
I přes tato opatření nomenklatura stále není dořešená a mnohdy je problematické alelu označit. Zejména se jedná o případy, kdy je mezi opakující se úseky vložen jiný, s některým odlišným nukleotidem (*Gomes, et al., 2009*).

## 5.2. Vazebné skupiny na X chromozomu

Vzhledem k tomu, že jsou testované lokusy na jednom chromozomu, mohou být ve vazbě a dědit se jako haplotypy. Jinými slovy jako určitý komplex alel, který je přenášen společně. Na chromozomu X jsou určeny 4 takové oblasti, konkrétně Xp 22.2, Xq 12, Xq 26 a Xq 28, oblasti se ale jako celky dědí nezávisle, tedy dochází mezi nimi k rekombinaci (*Tillmar, et al., 2008*). Výjimka nastává při přenosu z otce na dceru, kdy se X chromozom dědí jako haplotyp celý (*Szibor, et al., 2005*). Jediným výjimečným případem, je genetické onemocnění známé jako Klinefelterův syndrom, kdy má muž v genomu jednu kopii chromozomu Y a dvě kopie chromozomu X. Pak může docházet k rekombinaci mezi haplotypovými skupinami.

Síla vazby je udávána v centiMorganech (cM) a zpravidla 1Mb odpovídá 1cM neboli 1 rekombinační události na 100 meióz (*Szibor, et al., 2003*). Vlivem toho jsou alely v populaci ve vazebné nerovnováze, což prakticky znamená, že počet pozorovaných haplotypů je menší než teoreticky možný počet kombinací. Ač je kombinací méně, jsou haplotypy užitečné, protože většina z nich se v populaci vyskytuje jen s velmi malou frekvencí. Při posuzování příbuznosti musí být haplotyp bráný jako celek, tedy nesmí být posuzovány frekvence jednotlivých alel v populaci, ale frekvence celé kombinace. Rozdíly v distribuci alel jsou mezi příbuznými populacemi malé (*Edelmann, et al., 2002*).

Obr. č. 1 Rozložení lokusů a vazebných skupin na X chromozomu



Podle: <http://www.chrx-str.org/>

### 5.3. Testy příbuznosti

Určení příbuznosti či přímo paternity je záležitostí nejen forezní, ale provádí se i pro soukromé účely. Zejména v těchto případech se totiž ukazuje, že lokusy na X chromozomu mohou být popisnější, než lokusy autozomální (*Shin, et al., 2004*).

Testy jsou založené na faktu, že pokud nedojde k mutaci má potomek vždy jednu alelu od otce a druhou od matky. K mutacím může s určitou pravděpodobností docházet, ale pravděpodobnost, že by během jedné meiózy došlo ke dvěma mutacím a teoretický otec by se od svého potomka lišil ve dvou alelách, je velmi malá. V takových případech se soudí, že nejde o shodu. Obecně je možné říci, že i tam, kde k identifikaci postačí autozomální STR jsou X chromozomální dobrou metodou pro odstranění pochybnosti. Ukázalo se totiž, že záměna nukleotidu, zejména vlivem sklouznutí polymerázy, je na autozomech běžný jev (*Chen, et al., 2009*).

V testování příbuznosti může nastat několik situací, v nichž se různí důležitost informací, které můžeme z X chromozomu získat. Pokud máme určovat příbuzenský vztah a máme k dispozici celou trojici (otec, matka, dítě) pro testování postačí informace na autozomech (*Tillmar, et al., 2008*). Pokud se jedná o tzv. deficientní případy, je výhodné využít i informace z X chromozomu.

Jakmile jde o situaci otec – syn, informace z X chromozomu nejsou nijak průkazné, protože z otce na syna se přenáší vždy pouze chromozom Y. Ve vztahu matka – dcera je užitečnost lokusů na X chromozomu srovnatelná s autozomálními chromozomy. Jejich význam stoupá při prověřování vztahů otec – dcera a matka – syn. V prvním případě je jasné, že jeden X chromozom dcery musí odpovídat X chromozomu od otce (není možnost rekombinace), ve druhém je jasné, že veškerá informace na X chromozomu pochází od matky (*Zarrabeitia, et al., 2009*). Dědičnost spojená s X chromozomem se využívá i v případech, kdy je třeba prověřit vzdálenější příbuznost. Tato metoda ovšem selže, když je někde linie přerušena vztahem otec – syn (*Szibor, et al., 2005*).

### 5.4. Forezní praxe

Ve forezní praxi se využívají mikrosatelity k identifikaci podezřelých a obětí hromadných neštěstí jako jsou požáry, pády letadel... Mohou být jediným prostředkem, když nejsou těla v takovém stavu, aby se daly použít otisky prstů nebo zubní vzorce. Celkem je na X chromozomu 26 trinukleotidových a 90 tetranukleotidových repetice, ale využíváno je jen 18 tetranukleotidů, 3 trinukleotidy a jedna VNTR sekvence (*Butler, 2005*). Oběti katastrof se určují obdobně jako u testů paternity srovnáním s rodinnými

příslušníky, pokud nejsou k dispozici osobní věci zemřelého se vzorky DNA, a potom platí všechny zákonitosti uvedené výše. Co se týče identifikace podezřelých na základě stop, je u žen X stejně popisný jako jakýkoli autozom, u mužů má o něco nižší vypovídací hodnotu, protože mají jen jednu alelu.

V současnosti je pro forenzní účely dostupný kit Mentype Argus X-12, který kromě X-chromozomálních markerů obsahuje ještě marker pro amelogenin, který slouží k určení pohlaví testované osoby (Kao, *et al.*, 2007).

**Tab. č. 1 Přehled lokusů kitu Investigator Argus X-12**

Název lokusu	Lokalizace na chromozomu	Motiv	Alely	Vazebná skupina
Amelogenin X	Xp22.1 – 22.3	—	—	—
Amelogenin Y	Yp11.2	—	—	—
DXS8378	Xp22.31	[CTAT] <sub>x</sub>	7 – 15	1
DXS10148	Xp22.31	komplexní repetice	13.3 – 38.1	1
DXS10135	Xp22.32	[AAGA] <sub>x</sub> GAAAG [GAAA] <sub>y</sub>	13 – 39.2	1
DXS7132	Xq11.2	[TCTA] <sub>x</sub>	8 – 19	2
DXS10074	Xq12	[AAGA] <sub>x</sub>	4 – 21	2
DXS10079	Xq12	[AGAG] <sub>x</sub> TGAAAGAG [AGAA] <sub>y</sub> AGAG [AGAA] <sub>z</sub>	14 – 15	2
HPRTB	Xq26.2	[AGAT] <sub>x</sub>	7 - 19	3
DXS10101	Xq26.2	komplexní repetice	24 – 36	3
DXS10103	Xq26.2	komplexní repetice	15 – 21	3
DXS7423	Xq28	[TCCA] <sub>x</sub> TCTGTCCT [TCCA] <sub>y</sub>	8 – 19	4
DXS10134	Xq28	komplexní repetice	28 – 44.3	4
DXS10146	Xq28	komplexní repetice	24 – 46.2	4

Podle: <http://www.sudmed.ru/index.php?act=Attach&type=post&id=4874>

Pozn.:  $x/y$  = počet opakování konkrétního motivu

— = data nejsou k dispozici

**Tab. č. 2 Přehled lokusů kitu X-STR DECAPLEX**

Název lokusu	Lokalizace na chromozomu	Motiv	Alely	Vazebná skupina
DXS8378	Xp22.31	[CTAT] <sub>x</sub>	7 – 15	1
DXS7132	Obl.centromery	[TCTA] <sub>x</sub>	11 – 17	2
DXS6789	Xq21.33	—	14 – 25	2
DXS7423	Xq28	[TCCA] <sub>x</sub> TCTGTCCT [TCCA] <sub>y</sub>	8 – 19	4
DXS9902	Xp22.2	—	7 – 13	—
DXS9898	Xq21.31	[TATC] <sub>x</sub> ATC [TATC] <sub>y</sub>	8,3; 9 – 15	—
DXS6809	Xq21.33	komplexní repetice	27 – 38	—
DXS7133	Xq22.3	[ATAG] <sub>x</sub>	7 – 14	—
GATA172D05	Xq23	[TAGA] <sub>x</sub>	5 – 12	—
GATA31E08	Xq27.1	[AGAT] <sub>x</sub>	7,8,11,12	—

Podle: [http://www.gep-isfg.org/ISFG/English/Working\\_Commissions/Sexual\\_Chromosomes/crX2009esp.php](http://www.gep-isfg.org/ISFG/English/Working_Commissions/Sexual_Chromosomes/crX2009esp.php)  
<http://www.chrx-str.org/>

Pozn.:  $x/y$  = počet opakování konkrétního motivu  
 — = data nejsou k dispozici

### 5.5. Konkrétní situace a využití

Prvním příkladem může být deficientní případ, kdy máme dvě sestry a potenciálního otce, jehož genotyp neznáme. Přesto je tato situace řešitelná, pokud známe profil matky tohoto muže („babičky“ sester ve středu našeho zájmu). Všechny alely potenciálního otce by měly být u babičky nalezeny. Pokud navíc máme k dispozici bratry „otce“ je případ ještě zjednodušen. Je - li to skutečný otec, musí být jeho matka heterozygotní ve všech alelách, kde se bratři, včetně „otce“, neshodují.

Dalším možným příkladem je situace, kdy jsou potenciální otcové příbuzní – například otec a syn, pak bude mít X chromozom hlavní význam (*Szibor, 2007*). Naopak, pokud budou bratři, je 50% šance, že oba dva zdědí od matky stejný chromozom a tím pádem by nebyla informace z X chromozomu užitečná (*Silveira, et al., 2007*).



Vhodné využití je i při analýze ženských vzorků na pozadí mužské kontaminace, zde budou užitečnější než autozomy. Alely by mohly „splýnout“ s mužským vzorkem pouze za předpokladu, že by byla žena ve všech lokusech homozygotní (*Szibor, 2007*).

## 5.6. Lékařská diagnostika

Po analýze STR markerů se některé tkáně mohou jevit jako chiméry. (Chimerismus = přítomnost dvou geneticky odlišných buněčných linií v jedné tkáni.) Příčinou takového výsledku může být přítomnost nádorových buněk (*Lorenzi, et al., 2009*) nebo odmítnutí transplantátu. Onemocnění se ale může projevit i opačným způsobem, u rakovinových buněk se vlivem delecí na některých chromozomech heterozygoti projeví jako homozygoti. V těchto případech je ale využíváno víc různých chromozomů najednou, nejen chromozom X.

## 5.7. STR a identifikace zvířat

Repetitivní sekvence byly nalezeny u všech eukaryotních organismů, přičemž testování non-humánní DNA má význam především u druhů živočichů s úzkou sociální vazbou na člověka, které mohou být potenciálně spojeny s trestnými činy (jako psi, kočky, dobytek).

Identifikace zvířat s sebou nese několik problémů, které u aplikace této metody na člověka odpadají. Prvním problémem je v tomto případě statistické vyloučení, tedy určení pravděpodobnosti s jakou se v celé populaci vyskytuje stejná kombinace alel. Tato pravděpodobnost se počítá z frekvencí jednotlivých alel v populaci a právě tyto frekvence musí být u každého druhu určeny. Další komplikace je s inbreedními zvířaty, která jsou obtížněji identifikovatelná, kvůli vysokému stupni příbuznosti a další se způsoby izolace DNA, které musí být upravovány při práci s některými tkáněmi jako je například slonovina (*Cassidy, Gonzales, 2005*).

I v této oblasti se X chromozomální markery ukazují jako vhodný doplněk k analýze pomocí autozomů a Y chromozomu (*van Asch, et al., 2010*). Ověření příbuznosti tímto způsobem může být užitečné například při šlechtění.

## 5.8. Mutace a mutační rychlost

Mutace mohou mít za následek záměnu nukleotidů, pak se jedná o substituce, konkrétně o transice (výměna purinové báze za purin a pyrimidinové báze za pyrimidin) nebo transverze (purin za pyrimidin a naopak) nebo změnu počtu opakování (duplikace, delece, inserce). Hlavním mechanismem vzniku mutací je zřejmě sklouznutí vlákna při

replikaci. Mutace jsou ovlivňovány délkou a strukturou konkrétního lokusu, častěji se vyskytují u delších alel, alely s přerušnými repeticemi jsou k mutacím méně náchylné. Svou roli zřejmě hraje i pohlaví a věk, u starších otců je pravděpodobnost mutace vyšší (*Brinkmann, et al., 1998*).

Mutace bývají objeveny na základě porovnání potomka a rodičů, jakmile je nalezen rozdíl může se jednat se o mutaci. Problematika mutací je zásadní především při určování otcovství a při určování obětí hromadných katastrof. Vlivem mutace může být identita/paternita chybně vyloučena, ale může docházet i k falešné pozitivitě. Pokud se potomek liší pouze v jednom lokusu je vhodné provést dodatečné testy s více testovanými lokusy, případně využít právě chromozom X, pokud byli testovány pouze autozomy (*Chen, et al., 2009*).

Mutace v tandemových repeticích jsou spojené i s některými chorobami jako je výše popsaný syndrom fragilního X, na jiných chromozomech pak například Huntingtonova choroba (*Weber, Wong, 1993*).

## 6. Porovnání frekvencí alel v různých populacích

Pokud mají být některé lokusy využívány v kriminalistice, je třeba dobře znát stupeň jejich polymorfismu, rozložení alel v populaci a zda populace je či není v Hardy-Weibergově rovnováze. Pro X chromozomální STR je třeba znát i vazebnou situaci (*Robino, et al., 2006*). Na základě těchto frekvencí se počítají hodnoty jako například PD (power of discrimination), která říká do jaké míry je daná sada alel informativní.

Pro muže se spočte jako:  $1 - \sum_i f_i^2$ , pro ženy jako:  $1 - 2(\sum_i f_i^2) + \sum_i f_i^4$  kde  $f_i$  je frekvence i-té alely v populaci. Čím menší tedy budou frekvence alel v populaci, tím větší bude konečná hodnota – pravděpodobnost, že je tato kombinace unikátní. Pro paternitní spory se počítá obdobná hodnota MEC (mean exclusion chance), jejíž výpočty záleží na tom, zda je testován pouze otec a dcera, nebo celé trio (včetně matky), případně zda jde o test autozomálních markerů (*Szibor, et al., 2003*).

Jako ukázkou odlišnosti frekvencí jednotlivých alel uvádím srovnání frekvencí v různých světových populacích pro lokusy HPRTB (Xq26.2), DXS9898 (Xq21.31) a DXS6789 (Xq21.33). Z tabulek je jasně patrné, že mezi populacemi jsou velké rozdíly, v některých se vyskytuje menší počet alel, čili jsou méně polymorfní než ostatní, navíc frekvence jednotlivých alel velmi kolísají.

**Tab. č. 3 Frekvence alel lokusu HPRTB ve světových populacích**

Lokalita	Uganda	Kolumbie	Taiwan	Španělsko
Alela				
7	0,020	—	—	—
10	0,157	—	—	—
11	—	0,0061	0,0699	—
12	0,020	0,0915	0,2918	0,1172
12.2	—	—	—	0,0103
13	0,255	0,2317	0,3982	0,3000
14	0,275	0,3415	0,1824	0,1517
15	0,216	0,2348	0,0456	0,0345
16	0,039	0,0762	0,0122	0,0034
17	0,020	0,0092	—	—
18	—	0,0092	—	—

**Tab. č. 4 Frekvence alel lokusu DXS9898 ve světových populacích**

Lokalita	Uganda	Kolumbie	Taiwan	Španělsko
Alela				
7	0,039	0,0031	—	—
8.3	0,098	0,1098	0,0182	0,2966
10	0,098	0,0122	0,0030	0,0103
11	0,255	0,0732	0,0669	0,1552
12	0,235	0,3293	0,5623	0,2724
13	0,157	0,3933	0,2644	0,2034
14	0,118	0,0762	0,0790	0,0517
15	—	0,0031	0,0061	0,0103

**Tab. č. 5 Frekvence alel lokusu DXS6789 ve světových populacích**

Lokalita	Uganda	Kolumbie	Taiwan	Španělsko
Alela				
14	—	—	0,0061	0,0069
15	0,294	0,0366	0,1793	0,0172
16	0,078	0,1250	0,2796	0,0172
17	0,059	0,0061	0,0578	0,0034

18	0,020	0,0031	0,0061	—
19	0,157	0,0518	0,0152	0,0345
20	0,177	0,4759	0,1854	0,3828
21	0,137	0,1768	0,1581	0,2241
22	0,159	0,0945	0,0760	0,2276
23	0,020	0,0244	0,0274	0,0724
24	—	0,0031	0,0061	0,0138
25	—	0,0031	0,0030	—

Tab. č. 3 – 5 podle: *Gomes, et al., 2007; Pico, et al., 2008; Hwa, et al., 2009; Aler, et al., 2007*

## 7. Závěr

V posledních dvou dekádách zaznamenává využití genetiky v kriminalistice obrovský rozvoj. Analýza DNA je považována za běžnou ve všech typech případů. S jejich množstvím stoupá i počet těch, které je obtížné řešit pouze za pomoci původně využívaných autozomálních lokusů. Kromě chromozomu Y a mitochondriální DNA se dostávají do středu zájmu i testy lokusů na X chromozomu. Jejich hlavní doménou je řešení otázek týkajících se příbuznosti a testy paternity v tzv. deficientních sporech.

Jejich širokému využití do forenzní praxe stále brání nedostatek populačních dat, která jsou nezbytná pro stanovení pravděpodobnosti vyloučení – tedy statistické pravděpodobnosti, že se v populaci nachází další člověk se stejnou sestavou alel. Navíc je třeba dobře zmapovat vazebnou situaci na chromozomu a pravděpodobnost rekombinací v rámci vazebných skupin.

Nicméně je jasné, že testování X chromozomu je užitečnou metodou, minimálně jako podpůrná analýza k autozomálním lokusům.

## 8. Seznam zkratek

<b>Zkratka</b>	<b>Anglický význam</b>	<b>Český překlad</b>
bp	base pair	nukleotidový pár
cM	centiMorgan	centiMorgan
DNA	deoxyribonucleic acid	kyselina deoxyribonukleová
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate	deoxynukleotidtrifosfát
dsDNA	double-stranded DNA	dvouvláknová DNA
DTT	dithiothreitol	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	ethylendiamintetraoctová kyselina
FMR1	fragile X mental retardation 1	—
kb	kilo-base pair	tisíc nukleotidových párů
Mbp	mega-base pair	milión nukleotidových párů
MEC	Mean exclusion chance	—
PAR	pseudoautosomal region	pseudoautosomální oblast
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PD	power of discrimination	—
RFLP	restriction fragment length polymorphism	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RNA	ribonucleic acid	kyselina ribonukleová
SDS	sodium dodecyl sulfate	dodecylsírán sodný
STR	short tandem repeat	krátká tandemová repetice
ssDNA	single-stranded DNA	jednovláknenná DNA
SSR	simple sequence repeats	jednoduchá repetice
VNTR	variable number of tandem repeat	variabilní množství tandemových repetic
Xist	X-inactive specific transcript	—

## 9. Použité zdroje

### 9.1. Literatura

Aler, M., Sánchez-Diz, P., Gomes, I., Gisbert, M., Carracedo, A., Amorim, A., Gusmão, L. 2007. Genetic data of 10 X-STRs in a Spanish population sample. *Forensic Science International* 173: 193 - 196

Alford, R.L., Hammond, H.A., Coto, I., Caskey, C.T. 1994. Rapid and efficient resolution of parentage by amplification of short tandem repeat. *Am J Hum Genet* 55: 190 – 195

Alonso, A., Martín, P., Albarrán, C., García, P., García, O., Fernández de Simon, L., García-Hirschfeld, J., Sancho, M., de la Rúa, P., Fernández-Puigueras, J. 2004. Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Science International* 139: 141 - 149

Barakat, T.S., Gunhanlar, N., Gontan Pardo, C., Achame, E.M., Ghazvini, M., Boers, R., Kenter, A., Rentmeester, E., Grootegoed, J.A., Gribnau, J. 2011. RNF12 Activates Xist and is essential for X chromosome inactivation. *PLoS Genetics* 7: e1002001

Bärr, W., Brinkmann, B., Budowle, B., Carracedo, A., Gill, P., Lincoln, P., Mayr, W., Olaisen, B. 1997. DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Int J Leg Med* 110: 175 - 176

Borman, A.M., Fraser, M., Linton, Ch.J., Palmer, M.D., Johnson, E.M. 2010. An improved protocol for the preparation of the total genomic DNA from isolates from yeast and mould using Whatman FTA filter papers. *Mycopathologia* 169: 445 - 449

Brinkmann, B., Klintschar, M., Neuhuber, F., Hühne, J., Rolf, B. 1998. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet* 62:1408 - 1415

Brownstein, M.J., Carpten, J.D., Smith, J.R. 1996. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modification that facilitate genotyping. *Biotechniques* 6: 1004 - 1006

- Butler, J.M. 2005. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers. London: Elsevier
- Cassidy, B.G., Gonzales, R.A. 2005. DNA testing in animal forensics. *J Wildl Manage* 69: 1454 – 1462
- Cohen, J.D., Nichols, T., Brignone, L., Hall, S., Reiss, A.L. 2011. Insular volume reduction in fragile X syndrome. *Int. J. Devl Neuroscience* doi:10.1016/j.ijdevneu.2011.01.003
- Crouse, C.A., Rogers, S., Amriott, E., Gibson, S., Masibay, A. 1999. Analysis and interpretation of short tandem repeat micro variants and free-banded allele patterns using multiple allele detection systems. *J Forensic Sci* 44: 87 - 94
- Deakin, J.E., Chaumeil, J., Hore, T.A., Marshall Graves, J.A. 2009. Unravelling the evolutionary origins of X chromosome inactivation in mammals: insights from marsupials and monotremes. *Chromosome research* 17: 671 – 685
- de Vargas Wolfgramm, E., de Carvalho, F.M., da Costa Aguiar, V.R., de Nadai Sartori, M.P., Hirschfeld-Campolongo, G.C.R., Tsutsumida, W.M., Louro, I.D. 2009. Simplified buccal DNA extraction with FTA elute cards. *Forensic Science International: Genetics* 3: 125–127
- Drossman, H., Luckey, J.A., Kostichka, A.J., D’Cunha, J., Smith, L.M. 1990. High-speed separations of DNA sequencing reactions by capillary electrophoresis. *Anal Chem* 62: 900 - 903
- Edelmann, J., Hering, S., Kuhlisch, E., Szibor, R. 2002. Validation of the STR DXS7424 and the linkage situation on the X chromosome. *Forensic Science International* 125: 217 - 222
- Erickson, C.E., Stigler, K.A., Wink, L.K., Mullett, J.E., Kohn, A., Posey, D.J., McDougale, Ch.J. 2011. A prospective open-label study of aripiprazole in fragile X syndrome. *Psychopharmacology* DOI 10.1007/s00213-011-2194-7
- Fujii, K., Sekiguchi, K., Shimizu, K., Kasai, K. 2004. A new sequenced allelic ladder marker for D1S80 typing. *J Hum Genet* 49: 169 - 171

- Gill, P., Sparkes, R., Kimpton, C. 1997. Development of guidelines to designate alleles using an STR multiplex system. *Forensic Science International* 89: 185 - 197
- Gomes, I., Alves, C., Maxzud, K., Pereira, R., Prata, M.J., Sánchez-Diz, P., Carracedo, A., Amorim, A., Gusmão, L. 2007. Analysis of 10 X-STRs in three African populations. *Forensic Science International: Genetics* 1: 208 - 211
- Gomes, I., Prinz, M., Pereira, R., Bieschke, E., Mayr, W.R., Amorim, A., Carracedo, A., Gusmão, L. 2009. X-chromosome STR sequence variation, repeat structure, and nomenclature in humans and chimpanzees. *Int J Med* 123: 143 - 149
- Graves, J.A.M., Gécz, J., Hameister, H. 2002. Evolution of the human X – a smart and sexy chromosome that controls speciation and development. *Cytogenet Genome Res* 99: 141 – 145
- Hammond, H.A., Jin, L., Zhong, Y., Caskey, C.T., Chakraborty, R. 1994. Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. *Am J Hum Genet* 55: 175 - 189
- Hedman, M., Palo, J.U., Sajantila, A. 2009. X – STR diversity patterns in the Finnish and the Somali population. *Forensic Science International: Genetics* 3: 173 - 178
- Heid, Ch.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome research* 6: 986 - 994
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., Vogt, P.H. 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* 23: 504-511
- Hwa, H.-L., Chang, Y.-Y., Chun-I Lee, J., Yin, H.-Y., Chen, Y.-H., Tseng, L.-H., Su, Y.-N., Ko, T.-M. 2009. Thirteen X-chromosomal short tandem repeat multiplex data from Taiwanese. *Int J Legal Med* 123: 263 – 269
- Charchar, F.J., Svartman, M., El-Mogharbel, N., Ventura, M., Kirby, P., Matarazzo, M.R., Ciccodicola, A., Rocchi, M., D’Esposito, M., Marshall Graves, J.A. 2003. Complex events in the evolution of the human pseudoautosomal region 2 (PAR2). *Genome research* 13: 281 – 286



- Chen, D.-P., Tseng, Ch.-P., Tsai, S.-H., Wang, M.-Ch., Lu, S.-Ch., Wu, T.-L., Chang, P.-Y., Sun, Ch.-F. 2009. Use of X-linked short tandem repeat loci to confirm mutations in parentage caseworks. *Clinica Chimica Acta* 408: 29 – 33
- Chen, D.-P., Tseng, Ch.-P., Tsai, S.-H., Wu, T.-L., Lu, S.-Ch., Chang, P.-Y., Sun, Ch.-F. 2008. Systematic analysis of stutters to enhance the accuracy of chimerism testing. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 38: 264 - 272
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. 1985. Hypervariable „minisatellite“ regions in human DNA. *Nature* 317: 67 - 73
- Kao, L.-G., Tsai, L.-Ch., Lee, J.Ch.-I., Hsieh, H.-M. 2007. Controversial cases of human gender identification by amelogenin test. *Forensic science journal* 6: 69 - 71
- Kauppi, L., Barchi, M., Baudat, F., Romanienko, P.J., Keeney, S., Jasin, M. 2011. Distinct properties of the XY pseudoautosomal region crucial for male meiosis. *Science* 331: 916 – 920
- Köchl, S., Niederstätter, H., Parson, W. 2005. DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR. *Methods Mol Biol.* 297: 13 – 30
- Kondo, H., Tahira, T., Havashi, H., Osima, K., Hayashi, K. 2000. Microsatellite genotyping of post-PCR Fluorescently labeled markers. *BioTechniques* 29: 868 - 872
- Lahn, B.T., Page, D.C. 1999. Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science* 286: 964 – 967
- Larkin, A., Harbison, S.A. 1997. An improved method for STR analysis of bloodstained denim. *Int J Legal Med* 112: 388 – 390
- Lorenzi, P.L., Reinhold, W.C., Varma, S., Hutchinson, A.A., Pommier, Y., Chanock, S.J., Weinstein, J.N. 2009. DNA fingerprinting of the NCI-60 cell line panel. *Mol Cancer Ther* 8: 713 - 724
- Lygo, J.E., Johnson, P.E., Holdaway, D.J., Woodroffe, S., Whitaker, J.P., Clayton, T.M., Kimpton, C.P., Gill, P. 1994. The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. *Int J Leg Med* 107: 77 – 89

- Mandrekar, M.N., Erickson, A.M., Kopp, K., Krenke, B.E., Mandrekar, P.V., Nelson, R., Peterson, K., Shultz, J., Tereba, A., Westphal, N. 2001. Development of a human DNA quantitation system. *Croat Med J* 42: 336 - 339
- Maniatis, T., Jeffrey, A., van deSade, H. 1975. Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* 14: 3787 - 3794
- Nielsen, K., Mogensen, H.S., Hedman, J., Niedstätter, H., Parson, W., Morling, N. 2008. Comparison of five DNA quantification methods. *Forensic Science International: Genetics* 2: 226 - 230
- Park, Ch., Carrel, L., Makova, K.D. 2010. Strong purifying selection at genes escaping X chromosome inactivation. *Mol Biol Evol* 27: 2446–2450
- Paul, N., Shum, J., Le, T. 2010. Hot Start PCR. *Methods in Molecular Biology RT-PCR protocols* 3: 301 - 318
- Pena, S.D.J., Charkaborty, R., Epplen, J.T., Jeffreys, A.T. 1993. DNA fingerprinting: state of the science. Basel: Birkhäuser Verlag
- Pereira, R., Gomes, I., Amorim, A., Gusmão, L. 2007. Genetic diversity of 10 X chromosome STRs in northern Portugal. *Int J Leg Med* 121: 192 - 197
- Pico, A., Castillo, A., Vargas, C., Amorim, A., Gusmão, L. 2008. Genetic profile characterization and segregation analysis of 10 X-STRs in a sample from Santander, Colombia. *Int J Legal Med* 122: 347 - 351
- Puck, J.M., Willard, H.F. 1998. X inactivation in females with X-linked diseases. *The New England journal of medicine* 338: 325 - 328
- Renčiuk, D., Kypr, J., Vorlíčková, M. 2010. CGG repeats associated with fragile X chromosome form left-handed Z-DNA structure. *Biopolymers* 95: 174 – 181
- Robino, C., Giolitti, A., Gino, S., Torre, C. 2006. Development of two multiplex PCR systems for the analysis of 12 X-chromosomal STR loci in a northwestern Italian population sample. *Int J Legal Med* 120: 315 - 318

- Ross, M.T., Grafham, V., Coffey, A.J., Scherer, S., McLay, K., Muzny, D., Platzer, M., Howell, G.R., Burrows, Ch., Bird, Ch.P., et al. 2005. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 434: 325 – 337
- Rosser, Z.H., Balaesque, P., Jobling, M.A. 2009. Gene conversion between the X chromosome and the male-specific region of the Y chromosomem a translocation hotspot. *The American Journal of Human Genetics* 85: 130 - 134
- Shin, K.-J., Kwon, B.-K., Lee, S.-S., Yoo, J.-E., Park, M.J., Chung, U., Lee, H.-Y., Han, G.-R., Choi, J.-H., Kim, Ch.-Y. 2004. Five highly informative X-chromosomal STRs in Koreans. *Int J Legal Med* 118: 37 - 40
- Schneider, P.M. 2007. Scientific standards for studies in forensic genetics. *Forensic Science International* 165: 238 - 243
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233 - 235
- Silveira, D., Silva, F.F., Jesus, P.R., Whittle, M.R. 2007. Use of X-linked short tandem repeat loci in routine parentage casework. *Transfusion* 47: 1050 - 1053
- Singer, V.L., Jones, L.J., Yue, S.T., Haugland, R.P. 1997. Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Analytical Biochemistry* 249: 228 - 238
- Szibor, R. 2007. X-chromosomal markers: Past, present and future. *Forensic Science International: Genetics* 1: 93 – 99 REVIEW
- 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* 119: 363 - 369
- Szibor, R., Krawczak, M., Hering, S., Edelman, J., Kuhlisch, E., Krause, D. 2003. Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int J Legal Med* 117: 67 - 74 REVIEW
- Tillmar, A.O., Mostad, P., Egeland, T., Lindblom, B., Holmlund, G., Mentelius, K. 2008. Analysis of linkage and linkage disequilibrium for eight X-STR markers. *Forensic Science International: Genetics* 3: 37 – 41

- Tvedebrink, T., Eriksen, P.S., Mogensen, H.S., Morling, N. 2009. Estimating the probability of allelic drop-out of STR alleles in forensic genetics. *Forensic Science International: Genetics* 3: 222 - 226
- Urquhart, A., Kimpton, C.P., Downes, T.J., Gill, P. 1994. Variation in short tandem repeat sequences – a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int J Leg Med* 107: 13 – 20
- Vaiman, D. 2002. Fertility, sex determination, and the X chromosome. *Cytogenet genome Res* 99: 224 - 228
- van Asch, B., Pinheiro, R., Pereira, R., Alves, C., Pereira, V., Pereira, F., Gusmão, L., Amorim, A. 2010. A framework for the development of STR genotyping in domestic animal species: Characterization and population study of 12 canine X-chromosome loci. *Electrophoresis* 31: 303 - 308
- van der Velden, V.H.J., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., van Dongen, J.J.M. 2003. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 17: 1013 – 1034 REVIEW
- van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535 - 538
- Voytas, D. 2001. Agarose gel electrophoresis. *Curr Protocs Mol Biol*. Chapter 2: Unit 2.5A
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506 – 513
- Walsh, P.S., Varlao, J., Reynolds, R. 1992. A rapid chemiluminescence method for quantitation of human DNA. *Nucleic acid research* 20: 5061 - 5065
- Weber, J.L., Wong, C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2: 1123 - 1128

Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Gundry, C.N., Elenitoba-Johnson, K.J.S. 2001. Real-time multiplex PCR assay. *Methods* 25: 430 - 442

Zarrabeitia, M.T., Pinheiro, F., de Pancorbo, M.M., Cainé, L., Cardoso, S., Gusmão, L., Riancho, J.A. 2009. Analysis of 10 X-linked tetranucleotide markers in mixed and isolated populations. *Forensic Science International: Genetics* 3: 63 – 66

Zietkiewitz, E., Rafalski, A., Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-Anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176 - 183

## 9.2. Internetové zdroje

Applied Biosystems, Real Time PCR, Absolute vs Relative Quantification

<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/absolute-vs-relative-quantitation.html?ICID=EDI-Lrn3>

Československá společnost pro forenzní genetiku, Co je forenzní genetika

<http://www.cssfg.org/cz/1111/co-je-forezní-genetika/>

Československá společnost pro forenzní genetiku, Metody forenzní genetiky

<http://www.cssfg.org/cz/1113/metody-forezní-genetiky/>

Forensic ChrX research, Linkage table

<http://www.chrx-str.org/>

Mentype® Argus X-12 PCR Amplification Kit

[www.sudmed.ru/index.php?act=Attach&type=post&id=4874](http://www.sudmed.ru/index.php?act=Attach&type=post&id=4874)

National centre for biotechnology Information, Map viewer, Homo sapiens, Chromosome X

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=X>

National centre for biotechnology Information, Map viewer, Homo sapiens, Chromosome Y

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=Y>

National centre for biotechnology Information, Gene, DMD Dystrophin (Homo sapiens)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1756>

National centre for biotechnology Information, Online Mendelian inheritance in man,  
Incontinentia pigmenti; ip  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/308300>

National centre for biotechnology Information, Online Mendelian inheritance in man,  
WAS gene; WAS  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/300392>

National centre for biotechnology Information, Online Mendelian inheritance in man, X  
recessive disease  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

QUIAGEN, QIAquick 96 PCR Purification Kit  
<http://www.qiagen.com/products/dnacleanup/gelpercicleanupsystems/qiaquick96pcrpurificationkit.aspx#Tabs=t1>

Spanish and Portugese-speaking working group of ISFG, X-STR DECAPLEX  
[http://www.gep-isfg.org/ISFG/English/Working\\_Commissions/Sexual\\_Chromosomes/crX2009esp.php](http://www.gep-isfg.org/ISFG/English/Working_Commissions/Sexual_Chromosomes/crX2009esp.php)