

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
DOKTORSKE STUDIJE KLINIČKE MEDICINE**



**VARIJABILNOST MIKROSATELITSKIH LOKUSA
X HROMOZOMA U POPULACIJI VOJVODINE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor
Prof. dr Igor Veselinović

Kandidat
Asist. dr Dušan Vapa

Novi Sad, 2015. godine

Zahvalnica

Najiskrenije se zahvaljujem mentoru, prof. dr Igoru Veselinoviću, na ukazanom poverenju, nesebičnoj pomoći, strpljenju i profesionalnom odnosu punom razumevanja.

Zahvaljujem se članovima Komisije na saradnji i korisnim savetima, čime su doprineli da ova disertacija bude kvalitetnija.

Posebno se zahvaljujem Neveni Veličković, docentu sa Departmana za biologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, na pomoći oko statističkih analiza.

Zahvaljujem se kolegama Centra za sudsku medicinu na nesebičnoj podršci i dragocenoj pomoći koje su mi ukazali prilikom izrade disertacije.

Zahvalnost dugujem i svojoj porodici bez čijeg razumevanja i strpljenja ne bih mogao ostvariti željeni cilj.

Dušan

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Dušan Vapa
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Igor Veselinović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Varijabilnost mikrosatelitskih lokusa X hromozoma u populaciji Vojvodine
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srp./eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2015.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja 9 / stranica 135 / slika 25 / tabela 38 / grafikona 12 / referenci 168
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Sudska medicina
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Mikrosatelitski ponovci; DNK; Forenzička genetika; Kratki uzastopni ponovci; X hromozom; Sudska Medicina

UDK	340.6:577.21(043.3)
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Srbija
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	Kratki uzastopni ponovci predstavljaju klasu mikrosatelitskih segmenata DNK, rasprostranjenih širom genoma čoveka. Građeni su od uzastopno ponavljajućih sekvenci dužine 2-6 parova nukleotida. Zahvaljujući različitom broju ponavljanja repetitivne jedinice, većina mikrosatelitskih markera pokazuje visok stepen polimorfizma dužine, koji je moguće ispitati primenom tehnike lančane reakcije polimeraze. Pored utvrđivanja spornih srodničkih odnosa, analiza X hromozom mikrosatelitskih markera može se uspešno koristiti i u oblastima kriminalistike, humane identifikacije, populaciono-genetičkim i demografskim istraživanjima i dr. Cilj istraživanja je izrada populacione studije, iz koje će se izračunati broj i frekvencija alela, struktura i frekvencija haplotipova, utvrditi vrednosti relevantnih statističkih parametara, oceniti mogućnost primene analize X-STR markera u slučajevima iz oblasti medicinske kriminalistike, humane identifikacije i veštačenja spornih srodničkih odnosa u populaciji Vojvodine. Istraživanjem je obuhvaćeno 200 odraslih, međusobno nesrodnih osoba. Izolacija DNK materijala iz krvnih mrlja vršena je Chelex metodom, a amplifikacija dobijenih uzoraka DNK metodom PCR, uz korišćenje komercijalnog Menteype® Argus X-12 PCR Amplification Kit – a. Razdvajanje i detekcija dobijenih fragmenata izvršeno je kapilarnom elektroforezom GeneScan i Genotyper programom. Statistička obrada rezultata izvršena je pomoću Arlequin i GENEPOP programa. Za vizuelizaciju interpopulacionih genetičkih odnosa, upotrebljen je program POPTREE2 i koordinatna analiza (Principal Coordinate Analysis - PCoA). Dobijeni rezultati ukazuju da se analiza ispitivanih X-STR markera može uspešno primeniti u slučajevima iz oblasti medicinske kriminalistike, humane identifikacije i veštačenja spornih srodničkih odnosa u populaciji Vojvodine, kao i da mogu poslužiti kao osnova za dalja istraživanja u populaciono-genetičkim, antropološkim, demografskim i drugim oblastima.
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>Predsednik:</p> <p>Član:</p> <p>Član:</p> <p>Član:</p> <p>Član:</p>
---	--

University of Novi Sad
ACIMSI
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph.D. thesis
Author: AU	Dušan Vapa, MD
Mentor: MN	Professor Igor Veselinović, MD, PhD
Title: TI	Genetic variability of X chromosome microsatellite loci in population of Vojvodina
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Eng./serb.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2015.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	Number of chapters 9 / pages 135 / pictures 25 / graphs 12 / tables 38 / references 168
Scientific field SF	Medical science
Scientific discipline SD	Forensic genetics
Subject, Key words SKW	Microsatellite Repeats; DNA; Forensic Genetics; Tandem Repeat Sequences; X Chromosome; Forensic Medicine
UC	340.6:577.21(043.3)

Holding data: HD	Library of Medical Faculty, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad
Note: N	None
Abstract: AB	<p>Short tandem repeats (STR) represent a class of microsatellites, widely spread throughout the human genome, consisting of tandemly repeated sequences of 2-6 bp. Related to variation in the number of repeat unit displayed, most of microsatellites show a high degree of length polymorphism, investigated by the PCR techniques. The aim of this research is to create a population study, which will be used to calculate allele and haplotype frequencies, determine the value of relevant statistical parameters and assess the possibility of applying X-STR markers analysis in the fields of forensics, human identification and kinship testing. The study included 200 unrelated adults. DNA isolation was performed by Chelex method and DNA amplification by PCR, using commercial Mentype Argus X-12 PCR Amplification Kit. Separation and detection of fragments was obtained by capillary electrophoresis using GeneScan and Genotyper program. Statistical analysis of the result was performed using Arlequin and GENEPOP program. For visualization of interpopulation genetic distances POPTREE2 program and coordinate analysis (PCoA) was used. The results show that the analysis of X-STR markers can be successfully applied in the field of forensics, human identification and kinship testing in the population of Vojvodina, as well as to serve as a basis for further research in population genetic, anthropological, demographic and other scientific areas.</p>
Accepted on Scientific Board on: AS	
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	President: Member: Member: Member: Member:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED PROBLEMA	4
2.1. Genom čoveka	4
2.1.1. Funkcionalna organizacija genoma jedra.....	7
2.1.1.1. Struktura i raspored gena.....	7
2.1.1.2. Kodirajuća DNK	10
2.1.1.2.1. Geni koji kodiraju polipeptide	10
2.1.1.2.2. RNK geni	13
2.1.1.3. Nekodirajuća DNK.....	14
2.1.1.3.1. Uzastopno ponavljajuće sekvence DNK.....	14
2.1.1.3.2. Ponavljajuće sekvence DNK rasute po genomu ...	20
2.1.2. Genom mitohondrija.....	21
2.2. Karakteristike hromozoma	23
2.2.1. Molekularna organizacija hromozoma	23
2.2.2. X hromozom	28
2.3. X-STR markeri	34
2.3.1. Razvoj markera X hromozoma	34
2.3.2. Mikrosatelitski markeri X hromozoma	34
2.3.3. Etički aspekti analize X-STR markera	37
2.3.4. X-STR markeri u utvrđivanju identifikacije i srodstva.....	37
2.3.5. X-STR markeri u kriminalistici	38
2.3.6. Analiza haplotipova X-STR markera	39
2.4. Primena analize mikrosatelitskih markera	42
2.4.1. Autozomalni STR markeri	44
2.4.2. Amelogenin.....	45
2.4.3. Y-STR markeri	45
2.4.4. Mitohondrijska DNK.....	46
2.5. Metode i tehnologije analize DNK	48
2.5.1. Tehnike izolacije DNK.....	48
2.5.2. PCR metoda.....	51
2.5.3. Kapilarna elektroforeza.....	54

3. CILJ RADA	56
4. RADNA HIPOTEZA	57
5. MATERIJAL I METODE	58
5.1. Materijal	58
5.2. Metode	58
5.2.1. Izolacija jedarne DNK	58
5.2.2. Amplifikacija DNK.....	59
5.2.3. Detekcija produkata amplifikacije	60
5.2.4. Statistička obrada podataka	60
6. REZULTATI	63
6.1. Prikaz alela kompletnog uzorka	64
6.2. Frekvencije haplotipova	69
6.3. Frekvencije alela i statistički parametri	82
6.4. Interpopulaciona poređenja na osnovu genetičke distance	107
7. DISKUSIJA	112
8. ZAKLJUČAK	119
9. LITERATURA	122

1. UVOD

Forenzička nauka predstavlja deo velike slagalice, čije uklapanje započinje na mestu zločina, a završava se u sudnici, izricanjem presude. Jedna od ključnih forenzičkih disciplina jeste forenzička molekularna biologija. Promene u smislu nadgradnje ove discipline, prenele su svoj uticaj na druge forenzičke discipline, ali i na konačan ishod procesa koji od njih zavise. S obzirom na to, prilikom razmatranja sadašnjih i budućih trendova u forenzičkoj molekularnoj biologiji, neophodno je uzeti u obzir mogući uticaj, kako na same forenzičke nauke, tako i na srodne oblasti istraživanja.

Od svog nastanka, forenzička molekularna biologija imala je jedan od najbržih razvoja do sada, a ostavila je dubok trag i u pravosudnom sistemu. Naravno, razvoj nauke je, u znatnoj meri, zavisio i od tehnološkog razvoja, koji je omogućavao dobijanje veće osetljivosti primenjenih metoda, kao i veću informativnost rezultata izvršenih analiza dezoksiribonukleinske kiseline (DNK). S druge strane, razvoj forenzičkih nauka izazvao je pozitivnu reakciju pravosudnog sistema, koji je uveo neophodne izmene u prihvatanju novih forenzičkih DNK testova. Naravno, uvođenje novih metoda neretko je bilo praćeno debatama i neslaganjima, naročito o poštovanju pravnih i etičkih principa.¹

Varijabilnost među individuama u populaciji postoji i može se identifikovati na više različitih nivoa. Prva istraživanja su se odnosila na posmatranje postojanja fenotipske varijabilnosti (otisak prsta, AB0 sistem krvnih grupa...). Početkom 1980, posle otkrića humanih DNK polimorfizama, a nakon uspešnog kloniranja gena i dostupnosti restrikcionih enzima, otkriveni su molekularni markeri.

Nove tehnologije omogućile su direktno sekvenciranje DNK čime je moguća identifikacija velikog broja genetičkih varijacija. Ispitivanje DNK ukazalo je na postojanje genetičkih varijacija u egzonima, kao i u intronima. Genetička varijabilnost se može pojaviti na fenotipskom nivou ako razlike u redosledu nukleotida u DNK sekvenci uslovljavaju razlike u redosledu aminokiselina u proteinu, kodiranom tom DNK sekvencijom, i ako razlike u sekvenci aminokiselina utiču na funkciju enzima.

Najveći deo DNK jedra sadrži nekodirajuće sekvence, u vidu ponavljajućih jedinica koje se razlikuju prema veličini ponovljenih motiva i prema njihovom broju, a

u okviru alelnih varijanti. Kratki uzastopni ponovci (*Short Tandem Repeats* - STR) ili uzastopni ponovci varijabilnog broja (*Variable Number Tandem Repeats* - VNTR) definisani su kao mikrosateliti i minisateliti, nalaze se u svakom hromozomu, predstavljaju polimorfne multialelne sisteme i pogodan su materijal za molekularno-genetička istraživanja.

Jedna od najčešće korištenih molekularnih metoda bila je analiza polimorfnosti dužine restrikcionih fragmenata (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) i Southern hibridizacija. Zahvaljujući posebnoj primeni RFLP, britanski naučnik Jeffreys je, 1984. godine, otkrio mogućnost korištenja metode u cilju identifikacije osobe, i bio je prvi koji je koristio DNK polimorfizam u utvrđivanju očinstva, u procesima imigracije i slučajevima ubistva (iako se njegovo prvobitno istraživanje baziralo na pronalaženju markera za određena oboljenja). Otkriveni metod nazvan je "*DNA fingerprinting*", a razlikovao se od dotadašnjeg po tome, što su se lokusi analizirali pojedinačno, jedan za drugim, umesto svi istovremeno. U narednom periodu, naziv metode promenjen je u "*DNA typing*", kao i "*DNA profiling*", koji su više odgovarali samom procesu. Američki *Federal Bureau of Investigation* - FBI je 1999. godine napustio RFLP testiranje i uveo u zvaničnu upotrebu kratke uzastopno ponavljajuće sekvence DNK, prvenstveno mikrosatelite, s ponovcima dva do pet nukleotida, koji se uspešno analiziraju metodom lančane reakcija polimeraze (PCR).

Najnovija faza u evoluciji DNA polimorfizma je upotreba pojedinačnih nukleotida (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNP), koji su obično bialelni i lako se analiziraju.²

Napredak u tehnologijama genotipizacije i sekvenciranja omogućio je određivanje genetičke varijabilnosti na nivou genoma. Genomska varijabilnost mikrosatelitskih markera omogućava proučavanje procesa migracija tokom evolucije, ekspanzije i opadanje brojnosti stanovništva, kao i pravce prirodne selekcije. Takođe, omogućuje proučavanje genetičke strukture subpopulacija i populacija, i obim genetičke bliskosti, odnosno udaljenosti među populacijama uz korišćenje odgovarajućih statističkih metoda. Mikrosateliti se uspešno koriste i za demografska istraživanja i obezbeđuju značajne podatke pogodne za filogeografske studije.³

Ispitivanja mikrosatelitskih markera X hromozoma ukazuju na to da se analize navedenih markera mogu uspešno koristiti u populaciono-genetičkim studijama (za kvantifikovanje genetičkih varijacija unutar i između populacija, diferencijaciju

geografski izolovanih populacija...), kao i da predstavljaju značajno sredstvo u rešavanju kriminalističkih slučajeva i drugih slučajeva vezanih za sudsku medicinu.⁴

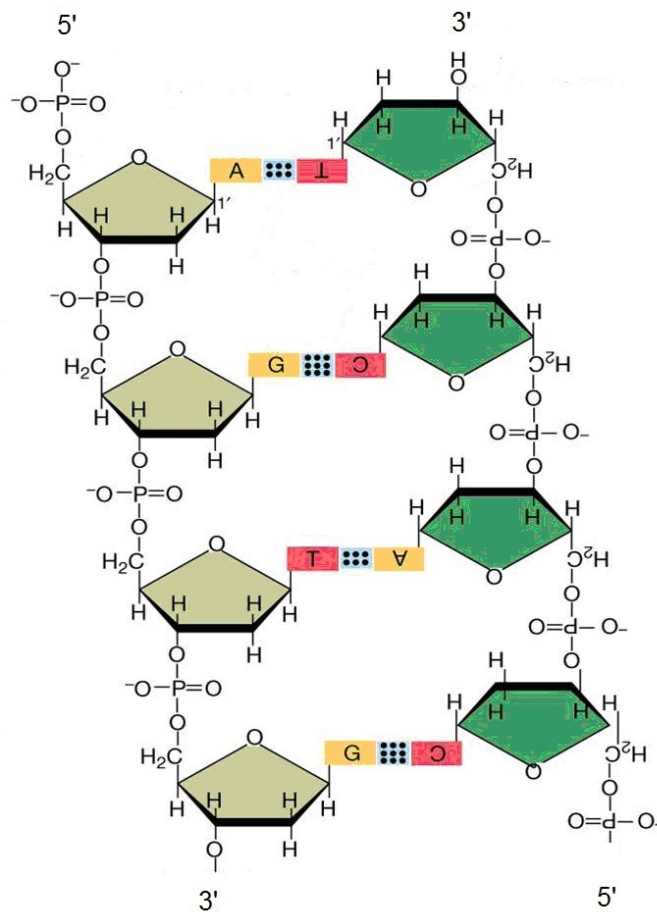
S obzirom na postojanje razlika u zastupljenosti i učestalosti pojedinih alela mikrosatelitskih lokusa u različitim populacijama, svaka institucija koja se bavi ispitivanjem mikrosatelitskih lokusa u forenzičke ili druge svrhe, mora posedovati podatke o populaciji na teritoriji na kojoj se nalazi. U našoj sredini, do sada, nisu vršena ispitivanja genetičke polimorfности mikrosatelitskih markera X hromozoma, te podaci o frekvenciji alela u populaciji Vojvodine, kao ni u Srbiji uopšte, nisu poznati.

2. PREGLED PROBLEMA

2.1. GENOM ČOVEKA

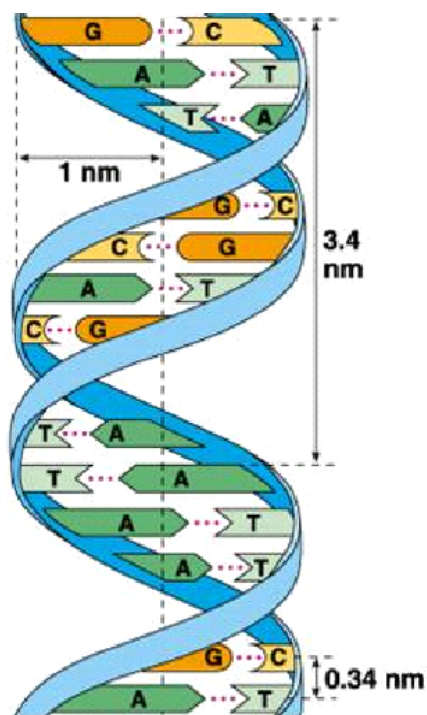
Genom predstavlja kompletan nasledni materijal jednog organizma ili, u užem smislu, to je kompletan nasledni materijal koji se nalazi u haploidnoj ćeliji. Sastoji se od 25 različitih tipova molekula DNK.

Jedinica građe molekula DNK je nukleotid koji se sastoji od azotne baze, purinske (adenin ili guanin) ili pirimidinske (citozin ili timin), šećera dezoksiriboze i fosfatne grupe. Azotna baza i dezoksiriboza su povezane N-glikozidnom vezom, a fosfatna grupa estarskom vezom za C5' atom dezoksiriboze. Nukleotidi su međusobno povezani fosfodiastarskim vezama u polinukleotidni lanac. Fosfatna grupa C5' atoma jedne dezoksiriboze vezuje se za C3' atom sledeće dezoksiriboze u nizu (Slika 1), te su terminalne grupe svakog polinukleotidnog lanca 5'-fosfat i 3'-hidroksi.



Slika 1. Šematski prikaz molekula DNK

U molekulu DNK polinukleotidni lanci povezani su vodoničnim vezama koje se obrazuju između komplementarnih azotnih baza. Adenin i timin se povezuju preko dve, a citozin i guanin preko tri vodonične veze, te je prečnik molekula DNK celom dužinom 2 nm. U molekulu DNK lanci su antiparalelni i spiralno udesno uvijeni, oko imaginarne ose, u dvostruku zavojnicu (heliks). Duž zavojnice se pružaju dva žljeba, različite širine i dubine, veliki i mali. Ovi žljebovi su značajni jer su to mesta gde DNK ostvaruje interakciju sa proteinima. Pun zavoj (360°) se pojavljuje na svakih 10 parova nukleotida, tj. na rastojanju od 3,4 nm (Slika 2). Ovaj tip DNK je tzv. B-DNK, prisutna uglavnom u hromozomima. Pored B zavojnice DNK, u ćeliji se mogu se naći i zavojnice tipa A i Z. Zavojnica A je desnogira, kraća i šira od B, i ima 11 baza po zavoju, dok je Z levogira i ima 12 baza po zavoju.



Slika 2. Struktura molekula DNK

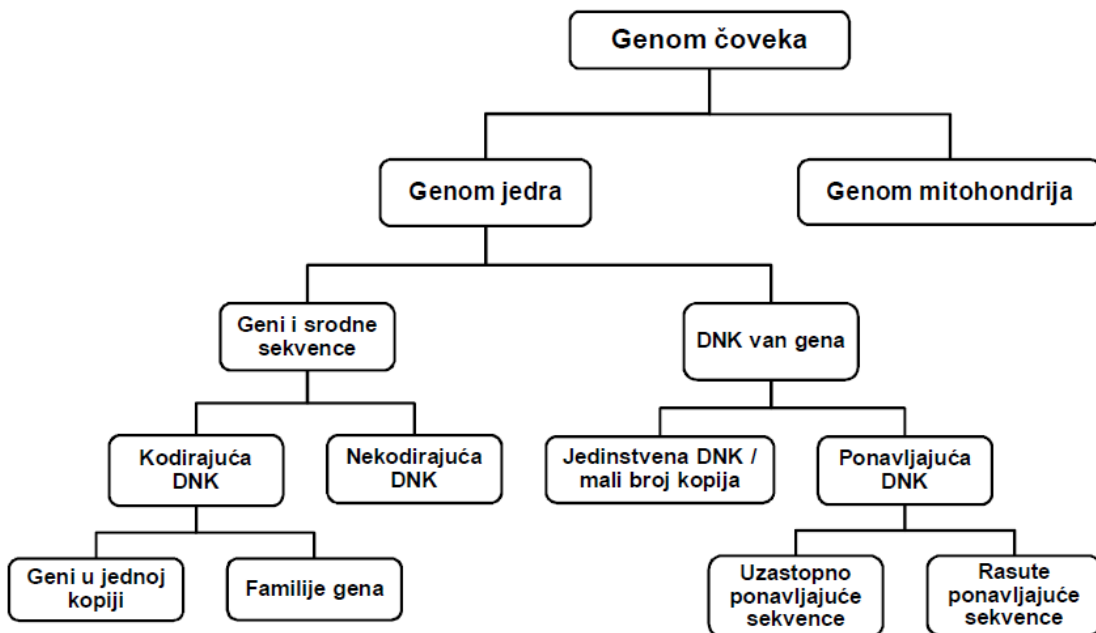
Molekuli DNK obezbeđuju čuvanje i prenošenje genetičkih informacija sa roditelja na potomke zahvaljujući sposobnosti samoreplikacije, i upravljaju sintezom proteina, te tako obezbeđuju održavanje životnih procesa u organizmu.

Ukupna količina DNK u genomu je specifična i karakteristična za različite biološke vrste i naziva se C vrednost. Ona najčešće nije u direktnoj korelaciji sa

evolucionim razvojem i kompleksnošću organizama što se naziva C paradoks (na primer, neki jednoćelijski organizmi, kao i neki vodozemci imaju mnogo veći genom od genoma čoveka).

Za razumevanje strukture i funkcije genoma pošlo se od njegove sekvence. Sekvenciranje genoma je izvršeno u okviru velikog projekta, *Human Genome Project* (HGP), u periodu od 1990. do 2003. godine, u kome je učestvovalo preko 20 institucija širom sveta. Donatori DNK su pripadali različitim polovima, rasama i socijalnim slojevima. Osnovni ciljevi projekta bili su mapiranje genoma i identifikacija gena, proučavanje polimorfnosti humane populacije, i kao krajnji cilj sekvenciranje humanog genoma.

Genom čoveka je složen i obuhvata genom jedra (nukleusa) i genom mitohondrija (Slika 3). Genom jedra sadrži 24 različita tipa linearnih molekula DNK, koji ulaze u sastav 24 tipa hromozoma, a genom mitohondrija je u vidu prstenastog molekula DNK i po strukturi je sličan genomu prokariota.



Slika 3. Organizacija genoma čoveka

2.1.1. Funkcionalna organizacija genoma jedra

Projekat genoma čoveka (HGP) fokusirao se primarno na sekvenciranje euhromatina, koji je bogat genima i predstavlja transkripciono aktivan region genoma jedra, a obuhvata 2,9 Gb. Ostalih 200 Mb čini transkripciono neaktivan (konstitutivni) heterohromatin, koji se sastoji od visoko ponavljajućih nizova DNK, koje je bilo teško precizno sekvencirati.

Kompozicija baza euhromatinske regije genoma jedra je u proseku 41% G+C, ali postoje varijacije između hromozoma (38% C+G u hromozomima 4 i 13, a 49% u hromozomu 19). Takođe duž istog hromozoma postoji varijabilnost u kompoziciji baza.

Različiti tipovi sekvenci DNK mogu biti jedanput zastupljeni u genomu ili se mogu ponavljati. Postoje duže sekvence DNK transkripciono aktivne, i kratke nekodirajuće sekvence, prisutne i u milion kopija.

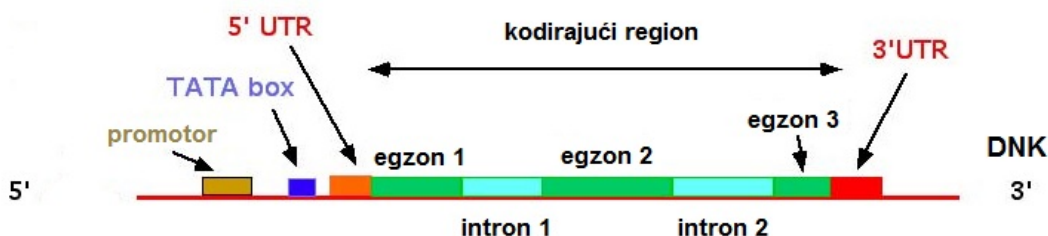
2.1.1.1. Struktura i raspored gena

Gen je deo DNK koji se transkribuje u molekul RNK koji kodira proteine, kao i u druge tipove molekula RNK. Sekvence koje kodiraju proteine čine 1,1% genoma, dok sekvence koje ne kodiraju proteine obuhvataju regulatorne sekvence, a deo čini tzv. „otpad“ ili *junk* DNK.

Većina gena su diskontinuirani, sadrže kodirajuće sekvence egzone, kod eukariota u proseku dužine 150 bp, i nekodirajuće sekvence introne, prosečne dužine 3500 bp. Samo izuzetno mali broj gena (na primer geni za interferone i histone) ne sadrže introne. Dužina introna unutar gena obično je veća u odnosu na dužinu egzona. Introni su rasuti između egzona, isecaju se i izbacuju tokom obrade primarnog prepisa RNK. U genomu čoveka ima oko 26 000 gena, a najbrojniji su tzv. strukturni geni koji kodiraju proteine, čija je prosečna veličina oko 27 000 bp. Primeri kraćih gena su gen za histon H4 od 500 bp i gen za insulin od 1 400 bp, dok je najveći gen za distrofin veličine 2 400 000 bp.^{5,6}

Na 5' kraju, ispred gena, nalazi se promotorski region koji sadrži veći broj AT bp i to je tzv. *TATA box*. Promotorski region se ne transkribuje, za njega se vezuju regulatorni proteini i enzimi, započinju proces transkripcije i regulišu ekspresiju gena. U sastav gena ulaze i delovi koji se ne prevode u proteine - na 5' kraju je region 5'UTR

(*Untranslated Region*) tzv. vodeća sekvenca, a na 3'kraju gena je 3'UTR koja sadrži signal za obrazovanje *poly A* repa, što se događa tokom obrade RNK (Slika 4).



Slika 4. Struktura gena

Kao rezultat projekta ljudskog genoma, pri sekvenciranju nuklearnog genoma, dobijen je velik broj informacija o svakom od hromozoma. Statistika hromozoma, zasnovana na informacijama o humanom genomu Sanger Instituta koje se nalaze u VEGA (*Vertebrate and Genome Annotation*) bazi podataka, ukazuje da su geni neujednačeno raspoređeni na hromozomima, a svaki hromozom u različitom stepenu, sadrži regione siromašne i bogate genima. Jasno se može uočiti da se na prvom hromozomu nalazi najveći broj gena (3148), dok Y hromozom poseduje najmanji broj gena (samo 125), a na njemu je sekvencioniran i najmanji broj baza (Tabela 1).

Prvi generalni uvid u raspored gena duž hromozoma je uočen Gimsa bojenjem (G trake). Visok sadržaj G+C, odnosno svetle trake prisutne su u regionima hromozoma bogatim genima. Takođe prisustvo CpG ostrva u DNK je u vezi sa prisustvom gena duž hromozoma.

Utvrđeno je, da je kod eukariota došlo do smanjene gustine gena zbog povećanja veličine gena, čemu je doprinelo prisustvo brojnih introna, povećanje veličine regulatornih sekvenci i povećanje veličine DNK između gena tj. intergenske sekvence.

Kopije gena mogu se nalaziti u okviru dela hromozoma ili mogu biti rasute na više hromozomskih lokacija. Duplikacije gena bile su česte tokom evolucije, a poznati mehanizmi duplikacije gena su:⁷

- tandemska duplikacija gena - obično je posledica nejednakog *crossing-over*-a,
- retrotranspozicija - nastaje kada se duplicirana kopija DNK integriše na novu subhromozomsku lokaciju,

Tabela 1. Statistika hromozoma čoveka⁸

Hromozom	Broj gena	Ukupan broj baza	Sekvencionirane baze
<u>1</u>	3,148	247,200,000	224,999,719
<u>2</u>	902	242,750,000	237,712,649
<u>3</u>	1,436	199,450,000	194,704,827
<u>4</u>	453	191,260,000	187,297,063
<u>5</u>	609	180,840,000	177,702,766
<u>6</u>	1,585	170,900,000	167,273,992
<u>7</u>	1,824	158,820,000	154,952,424
<u>8</u>	781	146,270,000	142,612,826
<u>9</u>	1,229	140,440,000	120,312,298
<u>10</u>	1,312	135,370,000	131,624,737
<u>11</u>	405	134,450,000	131,130,853
<u>12</u>	1,330	132,290,000	130,303,534
<u>13</u>	623	114,130,000	95,559,980
<u>14</u>	886	106,360,000	88,290,585
<u>15</u>	676	100,340,000	81,341,915
<u>16</u>	898	88,820,000	78,884,754
<u>17</u>	1,367	78,650,000	77,800,220
<u>18</u>	365	76,120,000	74,656,155
<u>19</u>	1,553	63,810,000	55,785,651
<u>20</u>	816	62,440,000	59,505,254
<u>21</u>	446	46,940,000	34,171,998
<u>22</u>	595	49,530,000	34,893,953
X	1,093	154,910,000	151,058,754
Y	125	57,740,000	22,429,293

- genska duplikacija fuzijama predačkih ćelija - primer su mitohondrije koje su se tokom evolucije endocitozom ubacile u ćelije eukariota, te se sada sintetišu specifične izoforme enzima, i ćelije domaćina i mitohondrijskog genoma,
- subgenomske duplikacije - nastaju kao rezultat translokacija velikih segmenata DNK euhromatinskog regiona
- duplikacije celog genoma - dešavale su se tokom evolucije.

2.1.1.2. Kodirajuća DNK

2.1.1.2.1. Geni koji kodiraju polipeptide

Jedarni genom sadrži gene koji kodiraju proteine, a koji se najčešće mogu naći kao pojedinačne strukture, odnosno jedinstveni nizovi nukleotida prisutni u samo jednoj kopiji u genomu. Ređe, ovi geni mogu se javljati u ponovljenim sekvencama.

Geni koji kodiraju polipeptide pokazuju varijacije u veličini i u unutrašnjoj organizaciji, a zauzimaju samo 1,1% genoma. Mali broj protein kodirajućih gena ne sadrži introne. Prosečna veličina egzona protein kodirajućih gena je oko 300 bp i nezavisna je od veličine gena. Postoji velika varijabilnost u dužini introna i uglavnom veliki geni imaju velike introne. Međutim transkripcija dugačkih introna traje dugo, te po pravilu, geni koji imaju izraženu ekspresiju imaju kratke introne.

Ponavljajuće sekvence DNK mogu se naći unutar egzona, introna, kao i u graničnim (*flanking*) sekvencama gena.

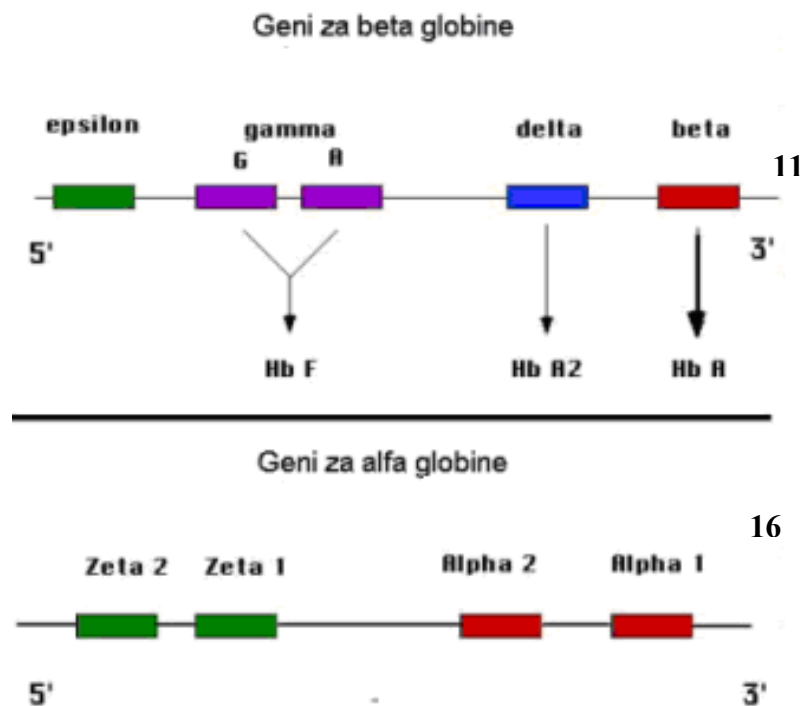
Gustina gena varira od hromozoma do hromozoma, a različita je i između različitih regiona istog hromozoma. U regionima gde je gustina gena veća mogu se naći geni koji se delimično preklapaju. Oni se često transkribuju sa suprotnog lanca DNK. Utvrđeno je da se 9% protein kodirajućih gena delimično preklapaju (na primer HLA geni).

Nekada su mali protein kodirajući geni locirani unutar introna drugih većih gena (gen za faktor zgrušavanja krvi ima dva gena, dok gen za neurofibromatozu ima tri gena unutar introna drugih gena). Velik broj introna sadrži gene za regulatorne molekule RNK.

Postoje primeri nekih kodirajućih gena koji imaju zajednički promotor. Oni mogu da se transkribuju u suprotnim smerovima, ili u istim, a tada proizvode multigene

transkripte za svaki gen. Ima i slučajeva da funkcionalno različiti proteini imaju zajednički prekursor (na primer A i B lanci insulina, hormon somatostatin i drugi).

Protein kodirajući geni slične strukture mogu biti udruženi u familije gena i mogu kodirati funkcionalno i strukturno srodne proteine tzv. familije proteina. Mogu biti u grupama na jednom hromozomu ili rasuti na više hromozoma u genomu. Ovakve familije gena su nastale duplikacijama gena tokom evolucije. Ako različiti geni kodiraju slične proteine smatra se da su nastali duplikacijama i to ne jako davno. Ovi geni su grupisani u istom regionu hromozoma. Međutim, ukoliko geni kodiraju proteine nešto izmenjenih sekvenci aminokiselina, tada se smatra da su nastali davno tokom evolucije translokacijama ili inverzijama, te se oni obično grupišu na različitim hromozomima. Npr. α -globin i β -globin familije gena prisutne su na hromozomima 16 i 11, čije su pojedinačne komponente aktivne na različitim stepenima razvoja jedinke, od embriona do adulta (Slika 5). Smatra se da su ove familije nastale duplikacijom predačkog gena pre oko 500 miliona godina.

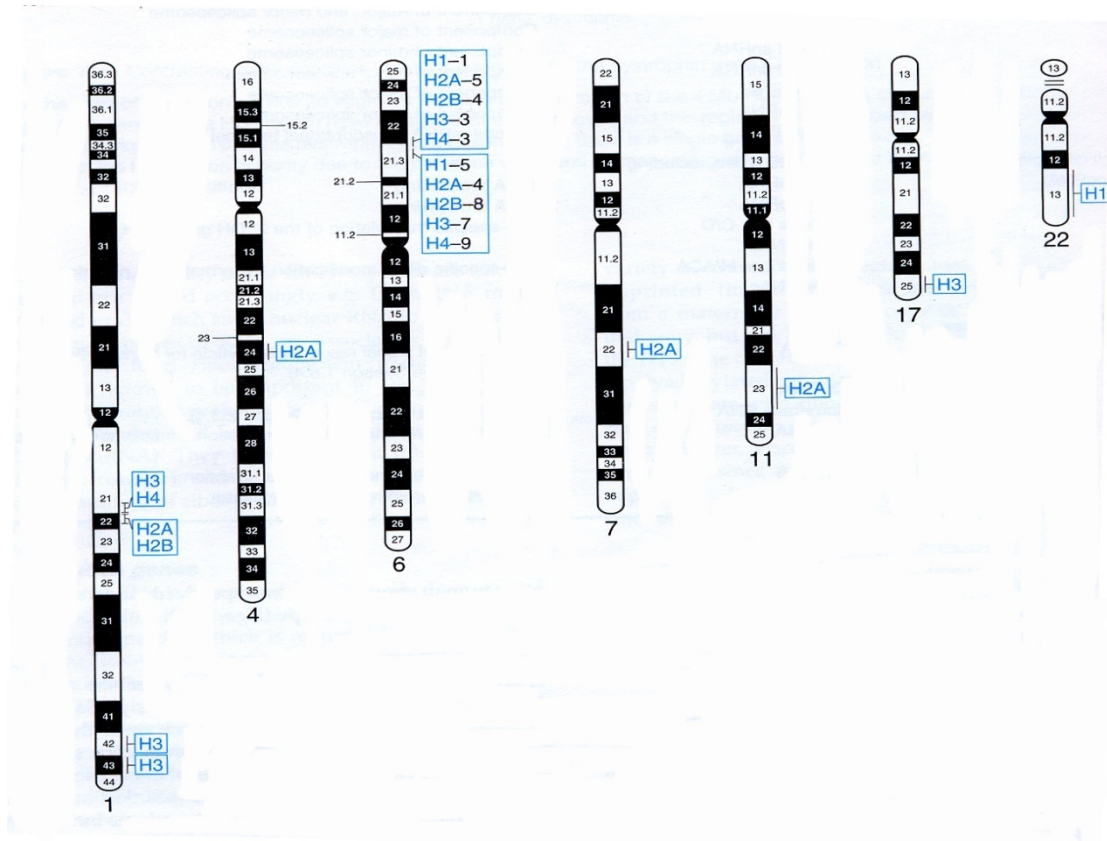


Slika 5. Familija alfa i beta globinskih gena čoveka

Multigenske familije obuhvataju dve grupe:

- klasične familije gena koje pokazuju visok stepen homologije sekvenci (na primer geni za histone),
- superfamilije koje imaju ograničenu homologiju sekvenci, ali su funkcionalno povezane (na primer HLA lokus, T receptori i imunoglobulini).

Genska familija koja poseduje visok stepen homologije sekvenci je genska familija za histone (Slika 6). Klasične familije gena obuhvataju kopije gena koji kodiraju histonske proteine H1, H2A, H2B, H3 i H4. Poznato je oko 20 uzastopno ponovljenih kopija svakog od gena koji su raspršeni u skupine na različitim hromozomima. Primeri familija gena su i geni za mirisne receptore, transkripcione faktore, aktin, imunoglobulin, proteine citoskeleta i dr.^{9,10}



Slika 6. Familije gena za histone¹¹

Genske familije mogu da sadrže i defektne genske kopije koje sadrže egzone funkcionalnih gena i nazivaju se pseudogeni. Ovi nekodirajući segmenti, pseudogeni, izgubili su sposobnost da kodiraju funkcionalni protein. Međutim, neki pseudogeni

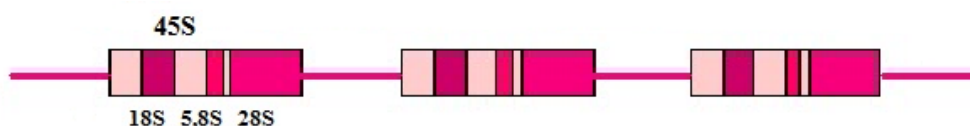
imaju sposobnost da regulišu protein kodirajuće gene tako što mogu da se transkribuju u RNK, a zatim u kratku interferirajuću iRNK, koja reguliše kodirajuće gene preko RNKi puta. Neki pseudogeni regulišu aktivnost tumor supresor gena i onkogeni. Smatra se da su pseudogeni nastali duplikacijom funkcionalnih gena i naknadnim mutacijama.^{12,13}

Postoje i okrnjeni geni kojima nedostaje jedan deo i genski fragmenti koji sadrže samo mali deo funkcionalnog gena, na primer, pojedinačni egzon.

2.1.1.2.2. RNK geni

RNK geni sastoje se od grupe identičnih gena, koji se višestruko ponavljaju, da bi proizveli dovoljne količine svojih produkata (npr. geni za rRNK i tRNK).

Za rRNK postoji preko 800 gena smeštenih većinom u sekundarnim suženjima akrocentričnih hromozoma (hromozomi 13, 14, 15, 21 i 22). Svaki gen predstavlja jednu transkripcionu jedinicu, od 45S rRNK, od koje se nakon obrade diferenciraju rRNK od 28S, 18S i 5,8S (Slika 7). Ovi genski regioni zajedno sa transkriptima obrazuju jedarce, pa su ti regioni nazvani organizatori jedarca (NOR - nukleolusni organizatori). Nakon obrade, rRNK ulaze, zajedno sa proteinima, u sastav velike i male subjedinice ribozoma. Geni za 5S rRNK nalaze se u grupama, a najveća grupa od 16 gena je na hromozomu 1q42.



Slika 7. Organizacija rRNK gena

Klasične familije gena za tRNK su raspršene u skupine na različitim hromozomima u celom genomu, a najviše ih je u okviru hromozoma 6, 1, 18, i 7, a nema ih na Y hromozomu. Poznato je preko 500 ponovljenih gena koji su članovi 51 multigene familije. Takođe, tu se nalazi i 324 pseudogena. Funkcija tRNK je prenos aminokiselina do ribozoma pri sintezi polipeptida.^{14,15}

U genomu su nađene i rasute familije gena za male jedarne molekule RNK, dužine 60 - 360 nukleotida, koje učestvuju u ekspresiji gena i u regulaciji genske ekspresije. Male jedarne molekule RNK sadrže visok sadržaj uridina i obuhvataju:

- familiju gena za snRNK (*small nuclear RNA*) – male jedarne RNK koje su uključene u sintezu snRNK, koja učestvuje u procesima splajsovanja RNK (isećanje introna iz primarnog transkripta RNK).

- familiju gena za male nukleolusne RNK (snoRNA- *small nucleolar RNA*), koji se transkribuju u klase malih RNK molekula koje upravljaju posttranskripcionim obradama prekursora rRNK u jedarcu.

- gene za mikro RNK (miRNA - *microRNA*) koji se nalaze u intragenkim regonima i u intronima. Transkribuju se u RNK molekule od 22 nukleotida, spadaju u grupu protein nekodirajućih RNK, imaju ulogu u posttranskripcionoj regulaciji genske ekspresije i utišavanju genske ekspresije.¹⁶

- mala interferirajuća RNK (siRNA - *small interfering RNA*) dužine 20 do 25 bp, dvolančana RNK molekula komplementarna sa iRNK koja se transkribuje u ćeliji. Uloga joj je u destrukciji iRNK posle transkripcije, čime se sprečava ekspresija gena.¹⁷

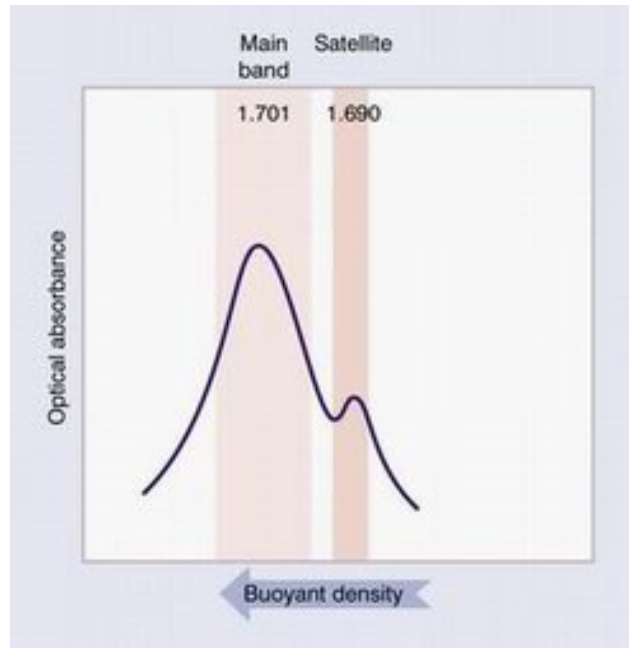
2.1.1.3. Nekodirajuća DNK

2.1.1.3.1. Uzastopno ponavljajuće sekvence DNK

Visoko ponovljiva DNK je uglavnom locirana izvan gena, u vidu kratkih uzastopnih ponovaka. Može se nalaziti u heterohromatinskim regijama i ulaziti u sastav centromera i telomera, ili su to kratki ponovci DNK rasuti po genomu, tzv. transpozoni. Uzastopno ponavljajuće sekvence DNK obuhvataju: satelite, megasatelite, minisatelite i mikrosatelite.

Satelitna DNK

Konstitutivni heterohromatin čini 6,5% genoma i sastoji se od nizova uzastopnih ponovaka nazvanih satelitna DNK. Satelite izgrađuju ponovljivi nizovi nukleotida dužine do 171 bp. Lako se odvajaju od ostale, glavne DNK centrifugiranjem u cezijum hlorid gradijentu gustine, pa se zato nazivaju satelitna ili prateća DNK (Slika 8).



Slika 8. Glavnina DNK i satelitna DNK

Ova DNK se nalazi u konstitutivnom heterohromatinu oko centromera svih hromozoma, u regionima heterohromatina hromozoma 1, 9, 16 i 19. Ne transkribuje se, a nazvana je alfa satelitna ili alfoidna DNK. Takođe, postoji i beta satelitna DNK, čiji su ponovci dužine 68 bp, a nalaze se u heterohromatinskim centromernim regijama hromozoma Y i u kratkim kracima hromozoma 1, 9, 13, 14, 15, 21, 22.

Pored satelitne DNK utvrđeno je prisustvo minisatelitne i mikrosatelitne DNK. Za sada ne postoji konsenzus o preciznoj definiciji mini i mikrosatelita izvršenoj samo na osnovu broja ponovaka. Po nekim autorima granica između mikro i minisatelita može varirati između 6 i 10 ponovaka, ali je za tačnu klasifikaciju potrebno posmatrati, pored broja ponovaka u nizu, i dužinu ponovljenih nizova, njihovu distribuciju, kao i funkciju.¹⁸

Megasatelitna DNK

Prema nekim autorima postoje i megasateliti koji se nalaze u nekodirajućim delovima genoma. Ponavljajući nizovi nukleotida (repetitivne sekvence) su različite dužine i broja ponavljanja. Na primer, megasatelit RS447 na hromozomu 4p16.1, veoma je polimorfan i sadrži funkcionalan gen za enzim deubikvitinizacije USP17.¹⁹

Minisatelitna DNK

Minisatelitna DNK se sastoji od dve familije uzastopno ponovljenih, kratkih sekvenci - telomerne DNK i hipervarijabilne DNK.

Telomerna DNK sadrži ponovke od 6 bp, 5'-TTAGGG-3' koji se ponavljaju nekoliko stotina puta, učestvuju u građi telomera i služe u održavanju integriteta hromozoma.

Hipervarijabilna DNK je polimorfna, ima različit broj kratkih uzastopnih ponovaka od 10-64 bp, a nizovi ponovaka mogu biti u dužini do 20 kb. Može se naći u svim hromozomima, posebno u subteloцентриčnim regijama. Pošto broj ponovaka varira među različitim individuama, polimorfnost minisatelitne DNK može se koristiti u kriminalistici, kao i za utvrđivanje očinstva.

Mikrosatelitna DNK

Mikrosateliti su kratki uzastopni ponovci (*Short Tandem Repeats - STR*), prisutni u genomima većine bioloških vrsta, a kod čoveka zauzimaju oko 3% genoma. To su segmenti veoma polimorfne DNK, koji sadrže motive od 2 do 6 bp, uzastopno ponovljenih u nizu dužine do 150 bp. Na primer:

GTGTGTGTGT označavaju se kao (GT) 5

CTGCTGCTG označavaju se kao (CTG) 3

ACTCACTCACTC označavaju se kao (ACTC) 3

Broj ponovaka u bilo kojoj mikrosatelitnoj regiji je vrlo varijabilan, može iznositi do nekoliko stotina kopija ponovljenih jedinica u svakom mikrosatelitu. Mikrosateliti se najčešće sastoje od niza DNK nukleotida koji sadrže mono, di, tri, ili tetra nukleotidne uzastopne ponovke, po kojima se aleli određenog lokusa mogu razlikovati.^{9,18,20,21}

U populaciji može postojati mnogo alela, do 70 - 80 u jednom lokusu, pri čemu je svaki alel različite dužine. Homozigotna individua za neki lokus će imati isti broj ponovaka na oba homologna hromozoma, dok će heterozigotna imati različit broj ponovaka. Mikrosateliti se nasleđuju kodominantno.

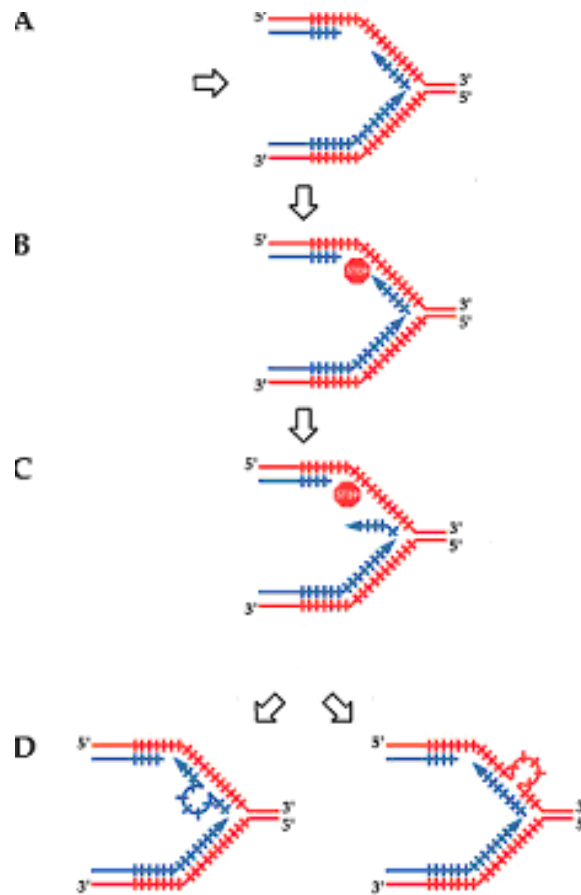
Mikrosateliti se pojavljuju i ponavljaju u kodirajućim i nekodirajućim regijama gena - u intronima, u 5'UTR i 3'UTR regionima, u promotorskim i intergenskim sekvencama. U nekodirajućim delovima DNK, najčešće su smešteni dinukleotidni

ponovci, a u kodirajućim, trinukleotidi i heksanukleotidni mikrosateliti kodiraju polipeptide, dok trinukleotidi mogu da uzrokuju nastanak raznih bolesti. U početnim fazama istraživanja, mikrosateliti su korišteni za analizu veze monogenских patologija sa određenim hromozomskim delovima, a kasnije su korišteni u asocijativnim studijama multifaktorijalnih bolesti. Ponovci lokalizovani u kodirajućim regijama gena dovode do promena u strukturi gena, u transkripciji, a kasnije i u konfiguraciji i funkciji molekula belančevina.^{22,23} Mikrosateliti imaju uticaj na regulaciju gena i funkciju proteina. Mogu imati regulatorne uloge u ekspresiji gena, a često su blisko vezani za protein kodirajuće regije.²⁴ Promena dužine mikrosatelita unutar promotora može promeniti ekspresiju gena.²⁵

Mikrosateliti su uglavnom nefunkcionalni delovi genoma, ali otkrićem dinamičkih mutacija došlo se do saznanja da neki mikrosateliti mogu biti i funkcionalni. Na primer, ekspanzija trinukleotidnih ponovaka, nizova od po tri nukleotida CGG (i do 1000 ponovaka) na kraju gena FMR-1 (**F**ragile **X** **M**ental **R**etardation) uslovljava pojavu sindroma lomljivog X. Mikrosateliti u okviru introna mogu da utiču na pojavu nekih oboljenja, npr. ekspanzija GAA tripleta, u prvom intronu gena X25, povezana je sa transkripcijom, a uzrokuje Fridrihovu (*Friedreich*) ataksiju²⁶, uzastopni ponovci prvog introna gena za asparagin sintetazu povezani su sa akutnom limfoblastičnom leukemijom²⁷, polimorfizam uzastopnih ponovaka u četvrtom intronu gena NOS3 povezan je sa hipertenzijom.²⁸ Ukoliko se trinukleotidi ponavljaju u povećanom broju, to uzrokuje nastanak Huntingtonove bolesti kao i brojnih neuroloških bolesti.²⁹ Ponekad su mnogi geni uključeni u nastanak bolesti, kao npr. u šizofreniji. Za pomenute bolesti, mikrosatelitske sekvence su korištene kao markeri za lociranje regije hromozoma sa odgovarajućim genima, što se naziva poziciono kloniranje. Mikrosatelitni markeri, bliski mutiranim genima, koreliraju sa nasleđivanjem bolesti, te se analizom tih markera unutar porodice, može predvideti kako će se bolest naslediti. Smanjen broj ponovaka u EGFR genu, povezan je sa osteosarkomom.¹⁸ Broj ponovljenih nizova nukleotida se razlikuje među jedinkama unutar populacije, te zbog velike polimorfnosti mikrosateliti imaju veliku primenu u identifikaciji DNK različitih osoba i u forenzici.⁴

Ubrzo nakon otkrića mikrosatelita, u ranim 1980-im, postalo je jasno da su uzastopni ponovci polimorfni i da imaju stopu mutacija čak i do 10^{-2} po lokusu, po generaciji.²¹ Korelacija između dužine mikrosatelita i stope mutacije je utvrđena u

analizama različitih organizama³⁰ i do sada nije tačno utvrđeno da li postoji linearni, kvadratni ili eksponencijalni odnos.^{31,32}



Slika 9. Model replikacionog proklizavanja

(A) Tokom replikacije novih lanaca DNK, može se zaustaviti replikacija na zaostajućem lancu (B). (C) Delimično odmotavanje zaostajućeg lanca može dovesti do replikacije proklizavanjem kada se replikacija ponovo pokrene, usled koje nastaje ekspanzija ili kontrakcija replikacionog segmenta. (D) Alternativno, delimično odmotavanje zaostajućeg lanca može rekombinacijom sestrinskih hromatida dovesti do kontrakcije ili ekspanzije.

Postoje dve osnovne hipoteze koje objašnjavaju kako mikrosateliti mutiraju.³³

- Polimerazno proklizavanje „*Polymerase slippage*” ili „*slipped-strand mispairing*” - kada se DNK replicira, polimeraza izostavlja nukleotide ili ih dodaje u većem broju od uobičajenog, u vidu ponovljenih jedinica (Slika 9). Rezultat toga je da novonastali lanac DNK ima različit broj ponovaka u odnosu na roditeljski. Sekvence, od dva ili tri ponovka, tako su distribuirane u celom

genomu. Proklizavanje se dešava u svakom mikrosatelitu oko jedanput na 1000 generacija. Većina proklizavanja rezultira u promeni jedne ponovljene jedinice, a stopa proklizavanja varira u odnosu na razlike u veličini ponovaka i različita je kod različitih vrsta.^{34,35}

- Nejednak *crossing-over* tokom mejoze dovodi do promena u broju ponovaka, obično jedan od homologih hromozoma nakon *crossing-overa* dobije višak ponovaka, a drugi manjak.³⁶

Pokazatelj mikrosatelitske nestabilnosti je genomsko okruženje mikrosatelita. Lokus gde se mikrosatelit nalazi utiče na njegovu stabilnost (npr. utvrđeno je da prisutnost drugih ponovaka u blizini jednog mikrosatelita smanjuje njegovu stabilnost). Sastav nukleotida, moguće stvaranje sekundarnih struktura, kao što je G-kvadridupleks i nivo transkripcije, takođe su uključeni u stabilnosti mikrosatelita.

S obzirom na to da su mikrosateliti veoma rasprostranjeni u genomima eukariota i vrlo varijabilni, na temelju PCR metode, koja zahteva male količine početnog materijala, oni su korišteni u različitim područjima istraživanja, kao što su:

- Forenzika - mikrosatelitni lokusi se koriste za forenzičku identifikaciju u kojoj je cilj povezati osumnjičenog sa uzorkom krvi, sperme ili kose uzete sa mesta zločina, ili povezati uzorak pronađen na odeći osumnjičenog sa žrtvom, kao i utvrditi postojanje silovanja ili incesta. Takođe, mogu se ispitivati sporni srodnički odnosi.
- Dijagnoza i identifikacija bolesti - promenom dužine mikrosatelita nastaju neke bolesti, a dužina mikrosatelita može da se menja u ranim fazama razvoja nekih tumora, tako da se mogu koristiti kao markeri za njihovo rano otkrivanje. Budući da su mikrosateliti polimorfni, koriste se u studijama vezanosti (*linkage studies*), koje pokušavaju locirati gene odgovorne za razne nasledne poremećaje. Mikrosateliti su povezani sa sledećim bolestima: sindrom fragilnog X (*Fragile X syndrome*) - gen FMR1/FMR2, miotonična distrofija - gen DMPK, Fridrihova (*Friedrich*) ataksija - gen X25, Kenedijeva (*Kennedy*) bolest - gen AR, Hantingtonova (*Huntington*) bolest - gen HD, spinocerebelarna ataksija - gen SCA1 i dr.
- Populacione studije - analizom varijacija mikrosatelita u populacijama, mogu se izvesti zaključci o strukturi populacija i razlikama unutar populacija, kao i između njih, pa čak i o vremenu postojanja zadnjeg zajedničkog pretka.³³

2.1.1.3.2. Ponavljajuće sekvence DNK rasute po genomu

Rasuti ponavljajući nizovi nukleotida (*Interspersed Tandem Repeats*) mogu, a ne moraju, da se transkribuju. To su nizovi nukleotida koji imaju sposobnost da menjaju svoje mesto u genomu. Zauzimaju 45% genoma i nazivaju se transpozoni ili mobilni genetički elementi. Oni prenose genetički materijal sa jednog na drugo mesto unutar istog hromozoma ili na različite hromozome, izazivajući mutacije gena i strukturne aberacije hromozoma. U zavisnosti od dejstva transpozicije razlikuju se dve klase transpozona:

- DNK transpozoni, prisutni sa oko 300 000 kopija, čine oko 3% genoma i kodiraju enzim transpozazu (koji je odgovoran za njihovo premeštanje). Segmenti DNK se isecaju i ubacuju na drugo mesto, premeštaju se u vidu „*cut/paste*”.
- Retrotranspozoni - nastaju transkripcijom DNK u RNK, a potom se ta RNK kopira u cDNK i služi kao matrica za sintezu drugog DNK lanca („*copy/paste*” mehanizam premeštanja). Kopirana DNK se ubacuje na drugo mesto u genomu. Ovo premeštanje, sa jednog mesta u genomu na drugo, odvija se uz pomoć RNK intermedijera i uz pomoć enzima reverzne transkriptaze. RNK transpozoni obuhvataju tri klase: duge rasute nuklearne nizove, kratke rasute nuklearne nizove i duge terminalne ponovke.

Dugi rasuti nuklearni nizovi (*Long Interspersed Nuclear Elements - LINEs*) su aktivni transpozoni koji se nalaze u euhromatinskim regijama. Najzastupljeniji su LINE koji obuhvataju tri familije gena LINE 1, LINE 2 i LINE 3 i čine oko 20% genoma. Familija Line 1 je najznačajnija i kodira RNK vezujuće proteine, proteine sa endonukleaznom aktivnošću i reverznu transkriptazu.

Kratki rasuti nuklearni nizovi (*Short Interspersed Nuclear Elements - SINEs*) obuhvataju Alu familiju koja poseduje visok sadržaj CG, nalazi se u euhromatinskim regijama, ali ne kodira proteine. Smatra se da Alu ponovci imaju ulogu u aktivaciji susednih gena i u održavanju stabilnosti genoma. Ugrađivanjem Alu ponovaka u genski alel i mutacijama u genu mogu nastati neke bolesti kao na primer neurofibromatoza.

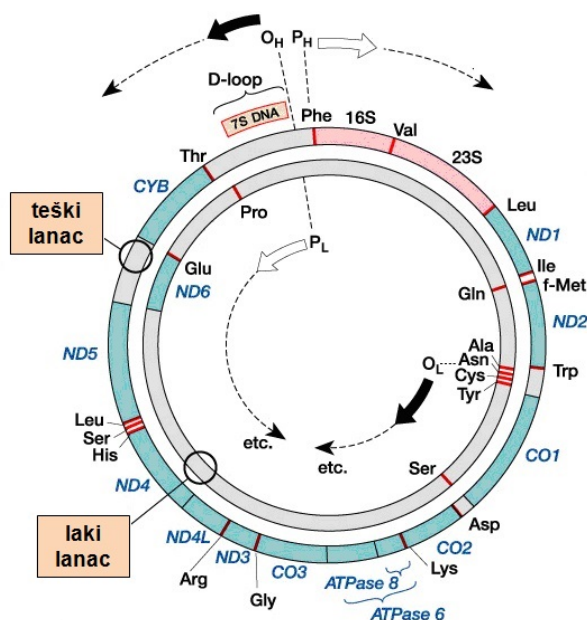
Dugi terminalni ponovci (*Long Terminal Repeats - LTR*) na krajevima imaju dugačke ponovljene sekvence. Endogene retroviralne sekvence sadrže gene *gag* i *pol* koji kodiraju proteazu, reverznu transkriptazu, RNK-azu i integrazu.

2.1.2. Genom mitohondrija

Dezoksiribonukleinska kiselina mitohondrija (mtDNK) nalazi se u vidu dvolančanog, prstenastog molekula. Dva lanca se međusobno razlikuju po sastavu baza - teški lanac sadrži više guanina, a laki lanac više citozina (Slika 10). Mitohondrijska DNK nije vezana za histone, a ima više C-G nego A-T parova. Sadrži ukupno 37 gena - 2 gena za rRNK (23S i 16S), 22 gena za tRNK i 13 gena za iRNK.

Geni mitohondrija ne sadrže introne. Kodirajuće sekvence nekih gena se delom preklapaju. Univerzalni genetički kod je u mtDNK izmenjen, mtDNK ima 60 kodona koji kodiraju aminokiseline i ima 4 stop kodona (UAA, UAG, AGA i AGG). Geni mtDNK kodiraju samo mali broj mitohondrijskih proteina, dok je većina mitohondrijskih proteina kodirana genima iz jedra, sintetisana u ribozomima citosola i transportovana u mitohondrije gde vrše određene funkcije.

Broj mtDNK zavisi od aktivnosti ćelije i njene potrebe za energijom. MtDNK se prenosi na potomstvo preko gameta majke. Pošto u ćelijama postoji veći broj mtDNK, neki od alela mogu mutirati, a neki ostati nepromenjeni, što se naziva heteroplazmija, a ukoliko su svi aleli identični, radi se o homoplazmiji. Dve nekodirajuće hipervarijabilne regije HV1 i HV2 u kontrolnom regionu, odnosno D petlji, posebno su interesantne za forenzične analize.



Slika 10. mtDNK

Tabela 2. Uporedni pregled karakteristika genoma jedra i genoma mitohondrija

	Genom jedra	Genom mitohondrija
Veličina	3,1 Gb	16,6 kb
Broj različitih molekula DNK	24, svi linearni	jedan, prstenasti molekul DNK
Ukupan broj DNK molekula	46 u diploidnoj ćeliji	velik broj kopija
DNK povezani proteini	histoni i nehistonski protein	uglavnom bez proteina
Gustina gena	oko 1/120 kb	1/0,45 kb
Ponovljiva DNK	više od 50%	malo
Introni	prisutni u većini gena	nema ih
Protein kodirajuća DNK	1,1%	oko 66%
Korišteni kodoni	61 za amino kiseline, i 3 stop kodona	60 za amino kiseline, i 4 stop kodona
Rekombinacije	prisutne	nisu prisutne

2.2. KARAKTERISTIKE HROMOZOMA

Prema veličini i obliku, autozomi čoveka svrstani su u 7 grupa, od A do G (Tabela 3). Polni hromozom X je srednje veličine i submetacentričan, sličan hromozomima C grupe, dok je polni hromozom Y, sitan i akrocentričan, sličan hromozomima G grupe. U toku dela ćelijskog ciklusa, interfazi, hromozomi su difuzno raspoređeni po jedru, dok se u vreme ćelijske deobe spiralizuju i mogu se uočiti pod mikroskopom kao pojedinačne strukture.

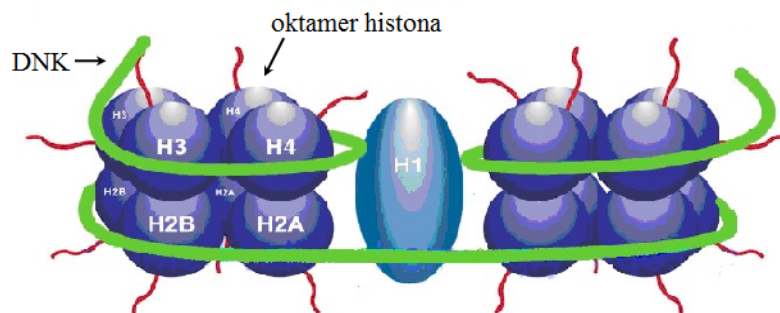
Tabela 3. Raspored hromozoma po grupama

Grupa	Hromozomski par	Oblik hromozoma
A	1, 2, 3	veliki, 1 i 3 par su metacentrični, 2 par je submetacentričan
B	4, 5	veliki, submetacentrični
C	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12	srednji, submetacentrični
D	13, 14, 15	srednji, akrocentrični
E	16, 17, 18	16 par je metacentričan, parovi 17 i 18 su submetacentrični
F	19, 20	mali, metacentrični
G	21, 22	mali, akrocentrični

2.2.1. Molekularna organizacija hromozoma

U sastav hromozoma, pored DNK koja čini oko 30%, ulazi i oko 30% histona, 30% drugih DNK vezujućih proteina i oko 10% RNK.

Histoni su proteini male molekulske mase (10-15 kDa) i poseduju veliku količinu pozitivno naelektrisanih aminokiselina lizina i arginina koji se lako povezuju sa negativno naelektrisanim fosfatnim grupama u molekulu DNK. Postoji pet glavnih tipova histona: H1, H2A, H2B, H3 i H4, koji omogućuju specifično pakovanje hromatinske niti u hromozom. Osnovna jedinica organizacije hromatina, nukleozom, sastoji se od oktamera histona H2A i H2B, kao i H3 i H4, koji je obavijen nepuna dva puta (odnosno 1,75), sa segmentom molekula DNK od 146 bp (Slika 11).

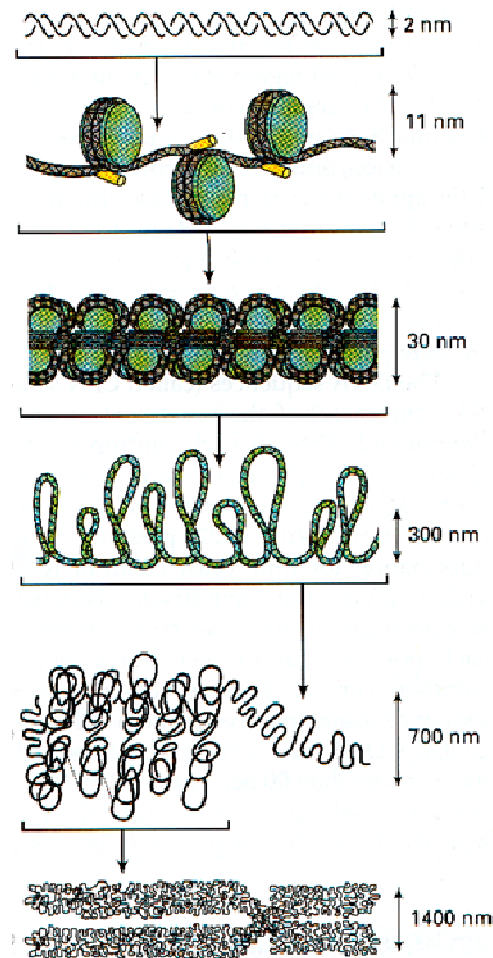


Slika 11. Građa nukleozoma

N-krajevi histona H2A, H2B, H3 i H4 pružaju se izvan nukleozoma, usmeravaju i stabilizuju namotavanje DNK. Oni podležu hemijskim modifikacijama (kao što su metilacija, acetilacija, fosforilacija), koje utiču na promene strukture i funkcije hromatina pri transkripciji, replikaciji, reparaciji, rekombinaciji, kondenzaciji hromatina i interakciji nukleozoma. DNK čvrsto pakovana sa histonima u nukleozome transkripciono je manje aktivna u odnosu na raspletenu DNK. Molekuli histona H1 se nalaze između nukleozoma i regulišu njihov prostorni raspored u DNK, formirajući strukturu koja podeća na „perlice na niski”. Sledeći nivo pakovanja hromatina predstavljen je sa po 6 nukleozoma i naziva se solenoid, dijametra 30 nm. Ova struktura se uvija u hromatinske petlje, a one se dalje uvijaju i kondenzuju u kompaktnu strukturu - hromozom (Slika 12).

Pošto su molekuli DNK veoma dugački, ovakav način udruživanja sa proteinima i njihovo pakovanje omogućuje smeštanje u jedro. U diploidnim ćelijama, dužina svih molekula DNK je dužine oko 2m, dok je jedro ćelije u proseku oko 10 -15 mikrometara. Delovi hromatina koji se transkribuju zadržavaju strukturu „perlica na niski”, dok se delovi koji ne podležu transkripciji zadržavaju na nivou strukture 30 nm ili na nivou kasnijih pakovanja hromatina. Poslednjih godina utvrđeno je da u ćeliji postoje dva tipa informacija, genetička, koja podrazumeva redosled nukleotida u molekulu DNK i epigenetička, koja podrazumeva modifikacije N - krajeva histona.

U jedru ćelije, u nukleoplazmi, postoje morfološki i funkcionalno dva tipa hromatina. Euhromatin, koji se transkribuje i heterohromatin, koji je uglavnom transkripciono neaktivan. Zastupljenost euhromatina i heterohromatina je različita u hromozomima (Tabela 4), a varira i duž hromozoma.



Slika 12. Pakovanje hromatina

Heterohromatin može biti:

- konstitutivni heterohromatin, koji se pojavljuje u oba homologna hromozoma, ali je promenljivog položaja i količine. Nalazi se u telomernim regionima i oko centromere, a ima ga mnogo u kratkim kracima akrocentričnih hromozoma, u dugom kraku Y hromozoma, kao i na dugim kracima hromozoma 1, 9 i 16.

- fakultativni heterohromatin je delimično neaktivni X polni hromozom ženki sisara, tzv. Barovo telo.

Nehistonska frakcija proteina obuhvata oko 100 različitih proteina i to su proteinski molekuli koji učestvuju u održavanju i formiranju viših nivoa organizacije hromatina, u kontroli i procesima replikacije i transkripcije, a mogu imati uticaja na ekspresiju gena i njihovu regulaciju. Tkivno su specifični i vezani za određeno funkcionalno stanje ćelije.

Tabela 4. Sadržaj DNK u hromozomima čoveka³⁷

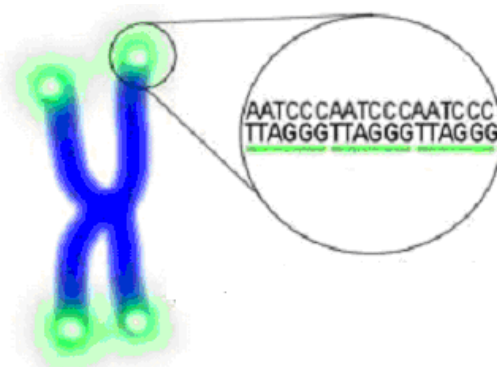
Hromozom	Ukupna DNK (Mb)	Euhromatin (Mb)	Heterohromatin (Mb)
1	249	224	19,5
2	243	240	2,9
3	198	197	1,5
4	191	188	3,0
5	181	178	0,3
6	171	168	2,3
7	159	156	4,6
8	146	143	2,2
9	141	120	18,0
10	136	133	2,5
11	135	131	4,8
12	134	131	4,3
13	115	96,3	17,2
14	107	88,3	17,2
15	103	82,1	18,3
16	90	79,0	10,0
17	81	78,7	7,5
18	78	74,6	1,4
19	59	60,8	0,3
20	63	60,6	1,8
21	48	34,2	11,6
22	51	35,1	14,3
X	155	151	3,0
Y	59	26,4	31,6

Tokom mitoze, u profazi i metafazi, na hromozomima se uočavaju hromatide povezane centromerom. Položaj centromere određuje oblik hromozoma i za nju se

vezuju proteinski molekuli formirajući kinetohore od kojih se pružaju mikrotubularne niti deobnog vretena, koje povlače hromosome na polove ćelije tokom ćelijskih deoba.

Centromerna DNK je građena od heterohromatina, odnosno visoko ponovljive, tzv. satelitne DNK i proteina tipa CENP-A, CENP-C, i CENP-T, koji su bitni za strukturne i funkcionalne aspekte centromere i kinetohore. CENP-A je od posebnog značaja jer je to varijanta histona H3. U sastav centromere ulazi nukleozom kakav se ne nalazi na drugim mestima duž hromozoma u genomu, a u kojem je histon H3 zamenjen s homologom - CENP-A ili CenH3. Ustvari gen CENP-A kodira centromerni protein, koji zamenjuje jednu ili obe kopije konvencionalnog histona H3 u okviru nukleozoma (H3 - H4). Centromerni proteini (CENPs) udružuju se sa centromernim hromatinom tokom ćelijskog ciklusa i potrebni su za funkciju kinetohore. Za razliku od glavine histona, CENP ne prati sintezu DNK u S-fazi već se okuplja u centromere u G1 fazi interfaze.^{38,39,40,41,42}

Telomere su specijalne, kratke, uzastopno ponovljive sekvence DNK, 5'-TTAGGG-3', povezane sa proteinima, a nalaze se na krajevima hromozoma (Slika 13). Pri tome su 3' krajevi DNK jednolančani u dužini od 12 - 16 bp. Telomeraza je ribonukleoproteinski kompleks, čija sekvenca RNK služi kao matrica za sintezu DNK u telomeri. Proteinska komponenta telomeraze funkcioniše kao reverzna transkriptaza (prepisuje RNK u DNK).



Slika 13. Struktura telomere

Telomere obezbeđuju stabilnost hromozoma i njihov integritet, skraćuju se pri ćelijskim deobama (pri svakoj deobi gubi se 50-200 bp), a imaju ulogu i u ćelijskom starenju. Enzim telomeraza katalizuje izduživanje telomera u ćelijama. Aktivacijom enzima telomeraze sprečava se skraćenje hromozoma i nastavljaju se deobe ćelija što najčešće dovodi do nastanak tumora.⁹

Pored primarnog suženja prisutnog na svim hromozomima, akrocentrični hromozomi grupa D i G, (hromozomi 13, 14, 15, 21 i 22), imaju na kratkim kracima i sekundarno suženje ili nukleolusni organizator (NOR). To je despiralizovan deo DNK koji učestvuje u obrazovanju nukleolusa i sadrži uzastopno ponovljene gene, koji kodiraju rRNK od 45S. Na samom kraju ovih akrocentričnih hromozoma se često uočavaju loptasti delovi, nazvani sateliti, koji ne sadrže gene. Pojava primarnih suženja, kao i satelita, mogu služiti kao markeri za pomenute hromozome.

2.2.2. X hromozom

Hromozomi X i Y, nastali su od para autozoma tokom poslednjih 300 miliona godina. U tom procesu, izvorni, funkcionalni elementi, geni, konzervirani su na X hromozomu, a Y hromozom je podlegao brojnim mutacijama i izgubio gotovo sve tragove autozoma, uključujući i gene koje je nekad delio sa X hromozomom. Tokom evolucije, polako je dolazilo do prestanka rekombinacija između X i Y hromozoma i degradacije Y hromozoma⁴³ (Slika 14).



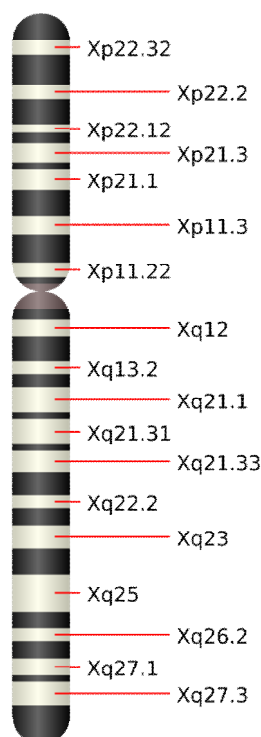
Slika 14. Polni hromozomi X i Y

X hromozom ljudi obuhvata 155 miliona baza i sadrži oko 1900 gena, što predstavlja oko 5% ukupne DNK u ćelijama žena, u odnosu na Y hromozom koji sadrži oko 59 miliona baza i 450 gena, što čini oko 2,5% DNK u ćelijama muškaraca (Tabela 5). Na X hromozomu postoji 824 gena koji kodiraju proteine, a samo 48 od njih imaju funkcionalne parove na mnogo manjem Y hromozomu.

Tabela 5. Karakteristike polnih hromozoma⁴⁴

	X hromozom	Y hromozom
Dužina	155,260,560	59,363,566
Sekvencionirano	151,100,560	25,653,566
Ukupan broj gena	1,943	451
Geni koji kodiraju proteine	824	48
Broj pseudogena	829	341

Standardni način za opisivanje lokacije pojedinih gena na hromozomu je sledeći: slovo X označava da se radi o polnom hromozomu X, (autozomi imaju brojeve od 1 do 22); Od centromera se ka krajevima pružaju kraci hromozoma, kratki (obeležava se sa „p” od francuske reči petit), i dugački („q”, pošto to slovo sledi posle p); Sledeći broj označava region hromozoma i traku na hromozomu dobijenu specifičnim bojenjem, a može se po potrebi dodati i zarez i broj subtrake u okviru tamne ili svetle zone; Broj koji pokazuje položaj gena se povećava udaljavanjem od centromere (Slika 15).



Slika 15. Prikaz X hromozoma

International Human Genome Sequencing Consortium je, do 2004, objavio sekvence hromozoma 5, 6, 7, 9, 10, 13, 14, 16, 19, 20, 21, 22 i Y, a kasnije je završeno sekvenciranje ostalih hromozoma. Utvrđeno je da u građi X hromozoma dominira euhromatin, dok se heterohromatin sreće samo u karakterističnim centromernim i telomernim regionima. Ovaj hromozom sadrži mnogo rasutih ponovaka i niži sadržaj GC baza (39%), u odnosu na prosek genoma (41%). LINE 1 ponovljeni elementi pokrivaju jednu trećinu X hromozoma. Srednja vrednost dužine gena X hromozoma je 49 kb. Na X hromozomu, u lokusu Xp21.1, nalazi se najveći do sada poznati gen u genomu čoveka, gen za distrofin (DMD), veličine 2.220.223 bp. Od svih hromozoma, X polni hromozom ima najmanju gustinu gena (isključujući pseudogene). To može biti rezultat niske gustine gena na autozomu predaka od kojeg je nastao X hromozom ili je selekcija tokom evolucije favorizovala prenos pojedinih gena sa hromozoma X na autozome. U skladu sa malom gustinom gena je i niska frekvencija CpG ostrva, 5,25 Mb, što je upola manje od proseka celog genoma. Egzoni 1.098 gena čine samo 1,7% sekvence X hromozoma, a samo 33% hromozoma se prepisuje. To je znatno ispod vrednosti procena za hromozome 6, 9, 10 i 13.^{45,46,47,48} Rasuti ponovci čine 56% od euhromatinske sekvence X hromozoma, u poređenju sa genomom gde ih ima prosečno 45%. Učestalost pojave Alu familija kratkih rasutih sekvenci (SINEs) je ispod proseka, što je u skladu sa smanjenom gustinom gena X hromozoma.

I pored relativno niske gustine gena, hromozom X ima istaknuto mesto u istraživanju i razumevanju ljudskih bolesti. Fenotipska ekspresija mutacija gena na X hromozomu je češća kod muškaraca, jer Y hromozomi ne nose odgovarajuće gene koji bi ih mogli kompenzovati. Više od 300 gena za različite bolesti mapirano je na X hromozomu, kao npr. geni za daltonizam, hemofiliju, različite oblike mentalne retardacije, Dišenovu (*Duchenne*) mišićnu distrofiju i niz drugih, dok je gotovo 10% gena na X hromozomu deo antigena raka testisa.⁴⁹

Hromozom X zauzima važno mesto u genomu i zajedno sa Y hromozomom utiče na diferencijaciju pola. Iako X hromozom ima velik broj gena, samo nekoliko od njih ima indirektnu ulogu u određivanju pola.

Geni koji se nalaze na segmentu Y hromozoma, koji nije homolog X hromozomu, nazivaju se holandrični geni ili Y-vezani geni. Deo euhromatinskog regiona, specifičan samo za Y hromozom, a samim tim i samo za muški pol, sadrži, između ostalih, i SRY (*sex determining region Y*). Gen SRY je okidač aktivnosti drugih

gena (na autozomima i polnim hromozomima) i ima ulogu u determinaciji pola, spermatogenezi i razvoju testisa. Pošto muškarci poseduju samo jedan X hromozom, oni su hemizigotni za odgovarajuće gene tog hromozoma. Kod ljudi, u osmoj nedelji razvića embriona, ako je SRY gen prisutan, uključuje se, i indiferentne gonade usmerava ka razviću u testise. Kada se to završi, testisi počinju lučiti androgene (testosteron i dihidrotestosteron). Androgeni izazvaju niz reakcija uključenja gena, koji usmeravaju razviće embriona u pravcu muškog pola. Svojstva koja se nalaze pod kontrolom ovih gena specifično se prenose samo u muškom delu populacije (sa oca na sina).

Neproportionalno velik broj Mendelovskih bolesti povezan je sa X hromozomom. Neke bolesti češće su prisutne kod muškaraca, nego kod žena. Takve bolesti, pod nazivom X-vezane recesivne bolesti, često su uzrokovane mutacijama u genima koji se nalaze na X hromozomu. X-vezana osobina ili bolest se prenosi od majke, na kćeri i sinove, a od oca samo na kćeri. Poznati primeri X-vezanog recesivnog nasleđivanja su daltonizam i hemofilija A. Dominantne X-vezane mutacije, u kojima je žena prenosilac sa samo jednim mutiranim genom, su retke. Jedan primer takve bolesti je vitamin D rezistentni rahitis. Hromozom X takođe može imati važnu ulogu u funkciji mozga i inteligenciji. Zbog ove fundamentalne genetičke razlike, bolesti uzrokovane genima sa X hromozoma mogu uticati različito na muškarce i žene, a time se i nasleđuju na neuobičajen način, tj. ne Mendelovski način.

Inaktivacija X hromozoma

Ista doza ekspresije gena sa X hromozoma, kod muških i ženskih jedinki, obezbeđena je posebnim procesom koji se naziva X inaktivacija, u kojoj su geni na jednom od X hromozoma ženskih jedinki delimično inaktivirani, a inaktivacija se odvija u ranim fazama embriogeneze.

Tokom ranog razvoja ženskog embriona, u fazi od oko 100 ćelija, u gastrulaciji, jedan od dva X polna hromozoma se delimično inaktivira. Inaktivaciji može podleći očev ili majčinski X hromozom, a Mary Lyon (1961-1962) je zaključila da se inaktivacija X hromozoma događa sasvim slučajno i nasleđuje se u svim narednim generacijama ćelija. Koji od dva X hromozoma će biti u svakoj somatskoj ćeliji inaktivisan je slučajna pojava, osim ako je jedan od X hromozoma neuobičajen (sadrži deleciju, inserciju, inverziju) i uvek se on inaktivira. Ovaj fenomen se zove X-

inaktivacija ili *lyonisation*, čime se stvara tzv. Barr-ovo telo. Ono obično leži uz membranu interfaznog jedra, u kondenzovanom stanju, i uvek se replicira kasnije od drugog X hromozoma. Barr-ovo telo se uočava u epitelnim ćelijama bukalne sluzokože ženskih jedinki, obično u oko 40% ćelija. Ono nije vidljivo u ćelijama hematopoeze i gametogeneze, kao ni kod normalnih muškaraca. X inaktivacija se ne odvija u ženskim gametama, u kojima su oba X hromozoma funkcionalna.⁵⁰

Inaktivacija X hromozoma sastoji se u delimičnoj inaktivaciji gena na jednom od X hromozomu, u ženskom fetusu, što rezultira nedostatkom proteinskog proizvoda inaktiviranog gena. X-inaktivacija osigurava da žene, poput muškaraca, imaju jednu funkcionalnu kopiju X hromozoma u svakoj somatskoj ćeliji. Inaktivaciji ne podležu grupe gena u pseudoautosomalnom regionu.⁵¹

Sekvence nukleotida na X inaktivacionom centru (*X inactivation center* - XIC), na X hromozomu, kontrolišu delimičnu inaktivaciju X hromozoma. Utvrđeno je da XIC centar sadrži 4 gena koji se ne prevode u protein. XIST lokus zauzima 32103 bp u regionu Xq13 i njegov transkript od 19275 bp se dalje ne prevodi. Nađeni su kraći XIST transkripti, koji su nastali alternativnom obradom. Nekodirajući molekul RNK se veže za X hromozom i dalje upravlja procesom delimične inaktivacije X hromozoma. Stabilnost inaktivacije je uzrokovana nizom kompleksnih molekularnih promena nazvanim epigenetičke modifikacije.⁴⁹

Pseudoautozomalni regioni

Na krajevima X i Y hromozoma nalaze se kratki homologni regioni, koji sinapsiraju tokom mejoze i podležu rekombinacijama - *crossing overu*, a nazivaju se pseudoautozomalni regioni, PAR1 i PAR2. PAR1 zauzima 2,6 Mbp na kratkim kracima X i Y hromozoma, a PAR2 je lociran na kraju dugih krakova i zauzima 320 kbp.⁵²

Tokom profaze I mejoze dolazi do sparivanja ovih homolognih regija X i Y hromozoma, te može doći i do pojave rekombinacija, što znači da će svojstva čiji se geni nalaze u tom regionu pokazivati način nasleđivanja identičan svojstvima čiji su geni na autozomima.⁴⁹ Do danas su opisana 24 gena u PAR1 regiji, pri čemu, za polovinu od njih nisu poznate funkcije. Nasuprot tome, samo 4 gena su otkrivena u PAR2 regiji. Utvrđeno je da postoji homologija X *transposed* regiona (XTR), na poziciji Xq21.3, sa regionom Yp11.2,⁵² kao i to da postoji više od 98% podudarnosti

između Xq21.3 i Yp11.2, odnosno u regionu koji je nazvan PAR3, gde se odvija proces rekombinacija.⁵³

2.3. X-STR MARKERI

2.3.1. Razvoj markera X hromozoma

Osnovna ideja o upotrebi X-hromozomskih markera u forenzici, nastala je u drugoj polovini dvadesetog veka, i to na osnovu istraživanja iz oblasti kliničke genetike. Postoje mnoge poznate bolesti ili stanja, kao što su npr. hemofilija, Dišenova mišićna distrofija, deficit enzima glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze (G6PD), daltonizam, itd., koje su posledica X-hromozomskog nasleđa.

U forenzičkim ispitivanjima srodstva, koje je započelo pedesetih godina prošlog veka, samo su markeri krvnih grupa igrali izvesnu ulogu. Kasnije su dopunjeni varijantama serumskih proteina i enzima. Međutim, svi oni imaju autozomalno nasleđivanje. Prvi značajan napredak X-hromozomskih markera bio je načinjen utvrđivanjem Xg^a krvne grupe^{54,55,56,57}, a njena povezanost sa X hromozomom se prepoznaje poređenjem frekvencije Xg^a/Xg fenotipa kod muškaraca i žena (muškarci 0,62/0,38, žene 0,86/0,14). Međutim, s obzirom na to da je krvna grupa Xg^a prilično slab antigen, ispitivanje se, u praksi, nije pokazalo kao značajan metod za utvrđivanje krvnog srodstva. Ipak, određena naučna pitanja, kao što je identifikacija porekla X hromozoma u hromozomskim aberacijama Klinefelter i Turner sindroma, bila su rešena korišćenjem serološkog Xg^a testiranja.^{54,57,58}

Nakon toga, otkrivena su još dva lokusa na X hromozomu, koji kodiraju polimorfne genske produkte, te su se mogli primeniti u testiranju krvnog srodstva. To su G6PD dehidrogenaza^{59,60,61,62} i fosfoglicerat kinaza (PGK)^{62,63} koji pokazuju značajne razlike na proteinskom nivou, u različitim geografskim oblastima. Klinički genetičari, koji su se bavili otkrivanjem Dišenove mišićne distrofije i hemofilije tipizacijom SNP-ova, uključili su u upotrebu minisatelit St14 (DXS52)⁶⁴, kao i analize polimorfizama dužine CA.^{65,66} Minisatelitni marker DXS52 je ispunjavao zahteve za forenzičke markere, ali se, i pored toga u forenzičkoj literaturi dosta retko pojavljuje.^{67,68}

2.3.2. Mikrosatelitski markeri X hromozoma

Prvi značajniji mikrosatelitski markeri, smešteni na X hromozomu, bili su HPRTB^{69,70,71,72,73} i ARA.^{70,71,74,75,76}

Formule za izračunavanje parametara neophodnih u forenzičkim analizama, a koje važe isključivo za nasleđivanje po X hromozomu, kreirane su tokom 1997. i 1998 godine.^{75,76} Slična formula, za rad sa markerima autozomalnih hromozoma objavljena je tridesetak godina ranije.⁷⁷

Dok je upotreba dinukleotidnih ponovaka uglavnom izbegavana, analiza tri, tetra i penta STR markera postala je široko rasprostranjena metoda u forenzičkoj medicini, a STR markeri smešteni na autozomima⁷⁸ koristili su se dugo pre upotrebe Y hromozomskih^{79,80,81,82} i X hromozomskih STR markera. Mada je postojanje X hromozomskih markera, tj. HPRTB (hypoxanthine phosphoribosyl transferase gene)^{69,70}, ARA (androgen receptor gene)^{70,74} i DXS981 (DNA - X chromosome - single copy - chromosome location 981)⁷⁵ bilo objavljeno relativno rano, korišćenje ovih markera, u forenzičke svrhe, pojavilo se znatno kasnije.

Interesovanje za markere smeštene na X hromozomu povećano je u poslednjih nekoliko godina, uglavnom iz razloga što predstavljaju kombinaciju poželjnih osobina drugih uobičajeno korištenih genetičkih markera. Kako autozomi, tako i X hromozom podleže rekombinaciji, a slično mitohondrijskoj DNK i Y hromozomu, ima polno vezan način nasleđivanja i omogućuje izradu haplotipova (samo kod muških osoba). Pored toga, određeni, komplikovaniji slučajevi utvrđivanja srodstva, npr. kod nedostatka potencijalnog oca od kojeg treba uzeti uzorak za analizu, mogu adekvatnije biti rešeni ovom metodom, u odnosu na dosadašnju praksu utvrđivanja srodstva putem analize autozomalnih i Y mikrosatelitskih markera. Pošto je relativno mali broj takvih slučajeva, manji broj naučnika se bavi ovom temom, te se i količina neophodnih podataka sporo uvećava. S druge strane, da bi se postigla sigurnost u naučnim zaključcima, oni moraju biti zasnovani na zapažanjima koje obezbeđuje solidna baza podataka. Shodno tome, razvila se ideja o prikupljanju što većeg broja podataka o distribuciji alela, frekvencijama, mutacijama, itd., dobijenih makar i iz pojedinačnih, manje obimnih studija, sa ciljem da se svi podaci šalju u jednu datoteku, koja bi se nalazila na određenom internet sajtu, a kojoj bi forenzička zajednica imala slobodan pristup. Slična baza podataka napravljena je sa podacima o analizi Y-STR markera, a nalazi se na stranici sajta www.yhrd.org. Osim toga, ukoliko druge naučne discipline (npr. evolutivna antropologija), fokusiraju svoju pažnju na markere X hromozoma, biće im potrebni podaci o ovim markerima, iz različitih delova sveta.

Utvrđivanjem broja i frekvencije alela, unutar i između populacija, može se doći do informacija o njihovoj strukturi, rastu, veličini i starosti.⁸³ Pored utvrđivanja frekvencije alela, važno je ustanoviti da li postoje genetičke substrukture unutar populacije, kao i genetičke varijacije između populacija. Jedna od najčešćih metoda kojom se utvrđuju pomenuti elementi, predstavlja metoda F statistike (Fst)⁸⁴, koja ima direktan odnos sa varijansom frekvencije alela unutar populacije, kao i između njih. Manje Fst vrednosti ukazuju na nisku genetičku diferencijaciju poređenih struktura unutar ili među populacijama, i obrnuto.

Razlog za kreiranje jedne ovakve baze podataka, koja bi sadržala varijante alela na ispitivanim lokusima, leži u činjenici da se svi forenzički statistički parametri procenjuju upravo na osnovu frekvencija tih alela, u datoj populaciji. Prema tome, da bi se dobili precizni rezultati, neosporivi u sudskim procesima, neophodno je utvrditi genetički diverzitet lokalne populacije. Početkom devedesetih godina, preporuka je bila da se prilikom kreiranja populacionih studija obezbedi uzorak od najmanje 100 do 150 ispitanika, pri čemu su ispitanici međusobno nesrodne osobe. U poslednje vreme, preporuke nalažu da se čak i za manje populacije, mora obezbediti uzorak od najmanje 200 ispitanika, a za objavljivanje rezultata u pojedinim naučnim časopisima neophodan je uzorak od 500 ispitanika, što zavisi od vrste ispitivanih markera.⁸⁵ U naučnim časopisima, vezanim za oblast populacionih studija, mogu se pronaći brojni radovi u kojima se objavljuju podaci o distribuciji i frekvenciji alela, za veliki broj populacija, rasprostranjenih širom sveta. Olakšan pristup takvim podacima, omogućava vršenje uporednih analiza rezultata ispitivane populacije, sa rezultatima ranije istraženih populacija, utvrđivanje eventualnih statistički značajnih razlika između populacija, preciznije izračunavanje forenzičkih statističkih parametara, kao i ocene mogućnosti primene metode u datom regionu. U forenzičkoj primeni je naročito važno uočiti eventualne substrukture unutar populacije (npr. razlika između frekvencije alela između muškaraca i žena), i uzeti ih u obzir prilikom tumačenja snage dokaza dobijenog DNK profila.⁸⁶

Dakle, kako bi analiza X-STR markera mogla biti praktično primenjena na našoj teritoriji, potrebno je napraviti populacionu studiju u kojoj će biti utvrđeni broj i frekvencije alela na svakom od analiziranih lokusa. Iz ovih, tzv. sirovih podataka, odredila bi se struktura i frekvencija haplotipova, a takođe i izračunali neophodni opšti i forenzički statistički parametri. Po dosadašnjim saznanjima, ovakva populaciona studija

nije rađena u našoj zemlji, te bi istraživanje mikrosatelitskih markera X hromozoma predstavljalo prvo istraživanje ove vrste u Srbiji.

2.3.3. Etički aspekti analize X-STR markera

Vodič Internacionalnog društva za forenzičku hemogenetiku daje preporuke za korišćenje X-STR markera.⁸⁷ Međutim, prilikom rada sa markerima X hromozoma, moraju se uzeti u obzir izvesni specifični molekularni, genetički i etički aspekti. Analizom X-STR markera moguće je otkriti hromozomske aberacije kao što su Klinefelter sindrom (XXY) ili Turner sindrom (X0). Ovakve informacije, do kojih se dolazi u toku forenzičkih analiza, trebalo bi da ostanu pod okriljem lekarske tajne, osim ukoliko ispitivana osoba sama ne želi da joj se, pored forenzičkih, saopšte i podaci o utvrđenim obolenjima. Iz etičkih principa, marker HumARA više se ne smatra pogodnim za forenzičke analize. Za razliku od svih ostalih markera, njegovi ponovci se nalaze u kodirajućem regionu gena, što znači da se analiziranjem ovog markera mogu otkriti neke bolesti, kao što su spinalna i bulbarna mišićna atrofija⁸⁸, povećan rizik za nepravilnu spermatogenezu⁸⁹ i za više vrsta malignih tumora (dojke, endometrijuma, debelog creva i prostate).⁹⁰

2.3.4. X-STR markeri u utvrđivanju identifikacije i srodstva

U slučaju potrebe za utvrđivanjem očinstva, obično se uzimaju uzorci krvi (ili bukalni bris) od deteta, majke i potencijalnog oca, a zatim se analiziraju pomoću autozomalnih STR markera, što bi trebalo da pribavi dovoljno informacija za potvrdu ili isključivanje potencijalnog oca. Međutim, ukoliko se posumnja da su potencijalni očevi ispitivanog deteta međusobno u srodstvu (npr. otac i sin), tada analiza X-STR markera pokazuje svoje prednosti u odnosu na autozomalne, a naročito ako se utvrđuje potencijalni otac ženskog deteta.

Ukoliko je neophodno utvrditi oca ženskog deteta, pri čemu je otac nedostupan za uzimanje uzorka, zahvaljujući analizi X-STR markera, moguće je iskoristiti uzorak uzet od majke nedostupnog oca, jer će se analiziranjem majčinog DNK profila moći sagledati i aleli koje je njen sin (a istovremeno potencijalni otac) nasledio. Upravo u ovakvim situacijama tzv. deficijentnim slučajevima, analiza markera vezanih za X hromozom predstavlja najjači forenzički adut.

Kada oba roditelja nisu dostupna za uzimanje uzorka, analizom X-STR markera uzoraka uzetih od sestara, koje nasleđuju X hromozom od svog oca, a samim tim i identične alele sa njegovog hromozoma, moguće je isključiti mušku osobu kao njihovog potencijalnog oca. Analizom autozomalnih markera sestara, isključivanje potencijalnog oca, ne bi bilo moguće izvršiti.

Prilikom utvrđivanja srodničkih odnosa, u sudskomedicinskoj praksi se najčešće radi o utvrđivanju očinstva, ali ponekad je neophodno utvrditi i majčinstvo. Za potvrde srodstva između majke i ženskog deteta, analize autozomalnih i X markera daju podjednak stepen informacija. Ukoliko, nakon analize autozomalnih markera, nije postignut dovoljan stepen verovatnoće poklapanja, naknadnom analizom X markera može se dodatno povisiti. Međutim, za potvrdu srodstva između majke i muškog deteta, analiza X markera je mnogo informativnija u odnosu na analizu autozomalnih markera, sa visokom moći isključivanja.

2.3.5. X-STR markeri u kriminalistici

Moć diskriminacije mikrosatelitskih markera X hromozoma, u mnogome zavisi od pola osobe čiji se tragovi analiziraju. Ovi markeri, pokazali su se kao bolji, a ujedno i efikasniji od analize autozomalnih markera, prilikom analize mešovitenih tragova, u kojima je potrebno izdvojiti DNK profil ženske osobe, iz mešovitenog traga u kojem dominira DNK profil muške osobe. Njihova prednost, u pomenutoj situaciji, ogleda se u tome što se aleli ženske osobe mogu kompletno poklopiti sa DNK profilom muške osobe, samo u slučaju da je ta ženska osoba homozigot za sve lokuse, što je, u praksi, gotovo nemoguće. Prema tome, najveći značaj i praktična primena X-STR markera podrazumevala bi situacije u kojima je neophodno identifikovati žensku osobu (npr. žrtvu silovanja), iz ćelija njene kože nađene ispod noktiju muške osobe (osumnjičenog) ili iz uzorka vaginalnih ćelija izuzetih sa njegovog polnog uda.

U suprotnoj situaciji, kada veći deo biološkog traga pripada ženskoj, a manji deo muškoj osobi, analizom X-STR markera, veća je verovatnoća da će se aleli muške osobe potpuno poklopiti sa DNK profilom ženske osobe, te je bolje koristiti markere autozomalnih hromozoma. Ako trag potiče samo od muških osoba, prednost se, takođe daje autozomalnim markerima.

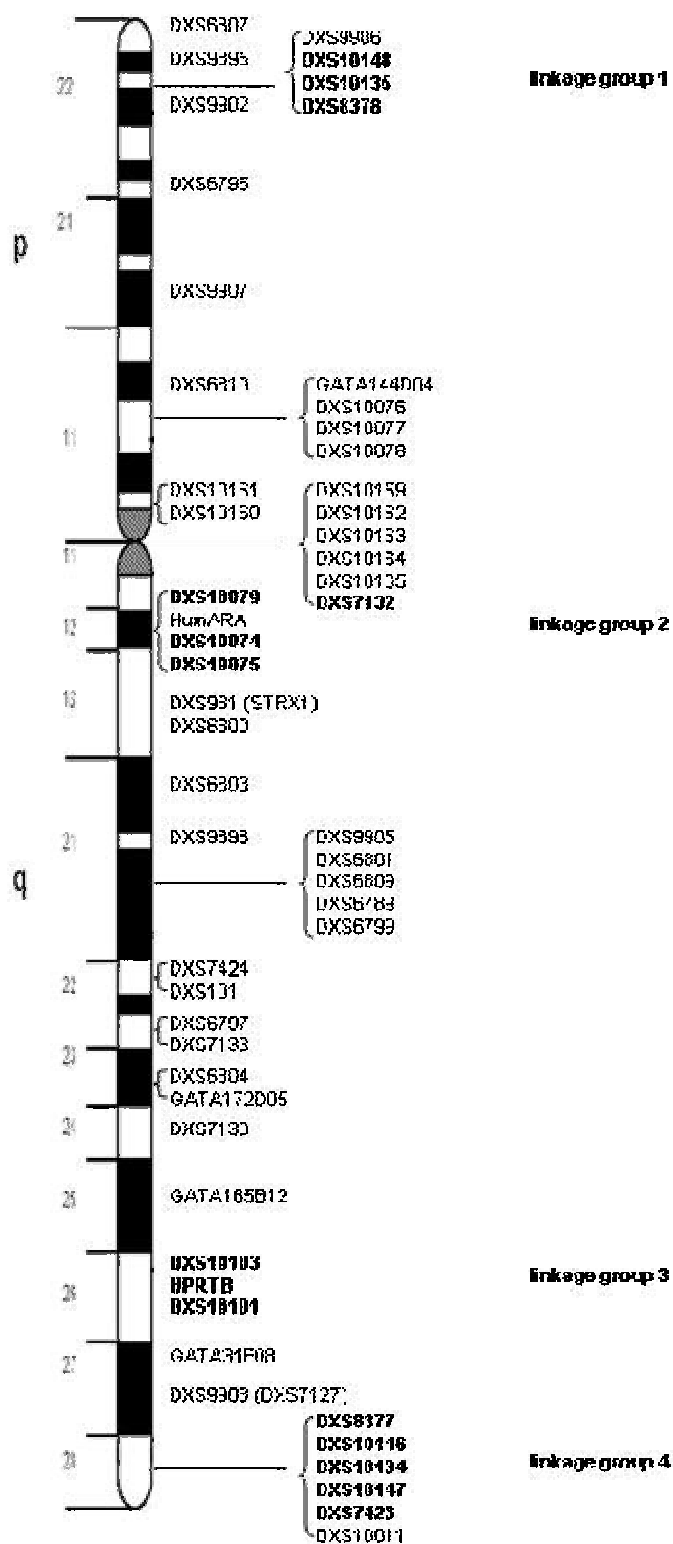
Ukoliko se analizira biološki trag koji potiče isključivo od ženskih osoba, X-STR i autozomalni markeri, podjednako su informativni.

2.3.6. Analiza haplotipova X-STR markera

S obzirom na to da muške osobe poseduju samo jedan X hromozom, kod njih su X-STR markeri u hemizigotnom stanju, a pošto se svi nalaze na istom hromozomu, postoji mogućnost međusobne povezanosti. Ukoliko su ti markeri, odnosno lokusi, međusobno povezani, odnosno ukoliko se nalaze u *linkage disequilibriumu*, ne mogu se nezavisno razdvajati. U tom slučaju, radi efikasnijeg analiziranja, ovi markeri dele se u 4 vezane grupe, sa po određenim brojem markera u svakoj grupi, u zavisnosti od komercijalnog kita korišćenog pri analizi. Grupe daju nezavisne genotipske informacije. Sa praktičnog gledišta, četiri nevezana markera, tj. DSX8378, DXS7132, HPRTB i DXS7423, su izabrana i označena kao jezgro za četiri vezane grupe. Ovaj niz nevezanih markera (plus amelogenin) može se analizirati upotrebom komercijalnog forenzičkog PCR komercijalnog kita *Mentype Argus X-UL*. Naknadno, kit je proširen dodatnim markerima, tako da je nastao *Mentype Argus 8-X*, koji poseduje 4 grupe, sa po dva markera u svakoj (DXS10135-DXS8378, DXS7132-DXS10074, HPRTB-DXS10101 i DXS7423-DXS10134).

Markeri komercijalnog kita *Mentype Argus X-12*, podeljeni su u 4 grupe, pri čemu svaka grupa sadrži po tri markera, a kombinacija ta tri markera predstavlja haplotip. Grupe su locirane na Xp22.2, Xq12, Xq26 i Xq28 (Slika 16), a svaka grupa zauzima manje od 0,5 centimorgana (cM). Centimorgan pokazuje koliko se često dešavaju rekombinacije u određenom regionu, a jedan centimorgan jednak je 1% šansi da će marker jednog lokusa na hromozomu biti razdvojen od markera drugog lokusa istog hromozoma, kao posledica rekombinacije tj. *crossing-overa*, u toku jedne generacije.

Zbog svega navedenog, može se reći da svaka grupa predstavlja stabilan haplotip, a verovatnoća mejotičke rekombinacije između njih je manja od 0,5%. Ukoliko postoji jače izražen *linkage disequilibrium*, haplotipovi se moraju odrediti direktno iz sirovih podataka populacionih studija, a ne iz već prethodno izračunatih frekvencija alela.⁴



Slika 16. Idiogram X hromozoma⁹¹

Razlike u distribuciji alela X hromozomskih markera, minimalne su kada se uporede bliske populacije.⁹² Međutim, ukoliko se vrši razmatranje u svetskim razmerama, mogu postojati značajne razlike u prisustvu određenih alela i u alelnoj frekvenciji.^{93,94,95} *Linkage disequilibrium* (LD), ili ne-slučajna povezanost alela, nije potpuno razjašnjena u humanom genomu. Ispitivanja LD između mikrosatelita, u novije vreme i između SNP,⁹⁶ dalo je novi uvid u poreklo i istoriju humane populacije. Primera radi, nivo LD je mnogo viši kod ne-Afričkih populacija nego kod Afričke populacije⁹⁶ i to može odražavati populacioni *bottleneck* (usko grlo) koji je u vezi sa poreklom ne-Afričke populacije⁹⁷. U suštini, analiza LD između markera X hromozoma može uputiti na etničku razliku sa visokim posledicama.^{98,99} Na taj način, ova ispitivanja mogu dopuniti rezultate istraživanja Y hromozomskih markera i mtDNK markera, o svetskoj migraciji ljudi.

2.4. PRIMENA ANALIZE MIKROSATELITSKIH MARKERA

Svaki alel, u sklopu određenog markera koji se koristi u forenzici, nalazi se u određenoj frekvenciji unutar populacije, odnosno poseduje određenu učestalost. Ono što je važno, jeste utvrditi kolika je njegova učestalost u populaciji, a samim tim kolika je moć tog markera u povezivanju dva DNK profila koji se porede (biološki trag - osumnjičeni, dve srodne osobe i dr.). Ukoliko se alel nalazi u populaciji, u učestalosti od 50% (poseduje ga svaka druga osoba), tada podatak, da biološki trag i osumnjičena osoba imaju isti marker, neće biti od velike koristi. Međutim, ukoliko se, u određenoj populaciji, taj alel nalazi kao jedan u milion osoba, takva informacija može biti od velike koristi.

U forenzičkim analizama, obično se ispituje više različitih markera, a potom se može izračunati ukupna vrednost genetičke podudarnosti, za čitav komercijalni kit koji se koristi. To praktično znači da će se sa svakim pridodatim markerom, ukupna vrednost podudarnosti povećavati. S obzirom na ranije pomenutu činjenicu, da postoje značajne razlike u zastupljenosti pojedinih alela u različitim populacijama, svaka institucija mora posedovati podatke o populaciji na svojoj teritoriji. Međutim, ispitivane populacije takođe moraju da ispune određene uslove. Prvi uslov je da se populacija nalazi u Hardy - Vajnbergovoj ravnoteži (*Hardy-Weinberg equilibrium*). Drugi uslov je da genotipovi, koji se nalaze na različitim lokusima, ne pokazuju međusobnu povezanost unutar populacije, što se naziva *linkage equilibrium (LE)*.

Hardy-Weinberg-ov princip zasnovan je na teoremi da frekvencija alela i genotipova u populaciji ostaje nepromenjena iz generacije u generaciju ukoliko su ispunjeni određeni uslovi.¹⁰⁰

- da populacija ostane u panmiksiji što znači da je populacija dovoljno velika, da u populaciji vlada slobodna oplodnja, da se iz svakog ukrštanja dobije podjednak broj jedinki i da odnos polova bude 1:1,
- da populacija ostane zatvorena, tj. da u njoj ne deluju faktori koji remete genetičku ravnotežu, kao što su migracija, mutacija, prirodna selekcija, genetički drift.

Najčešće se ne ostvare svi ovi uslovi u prirodi, te se vrednosti alelnih frekvencija kreću oko veličine koja predstavlja genetičku ravnotežu. Promenom jednog od uslova i ravnoteža se poremeti.

Frekvencije dominantnog i recesivnog alela izračunavaju se na sledeći način:

$$A = p$$

$$a = q \quad \text{pri čemu je}$$

$$p + q = 1$$

Očekivane frekvencije genotipova su

$$AA = p^2 \quad \text{za homozigote AA}$$

$$aa = q^2 \quad \text{za homozigote aa i}$$

$$Aa = 2pq \quad \text{za heterozigote}$$

Odnosi frekvencija genotipova p^2 , $2pq$ i q^2 se nazvaju Hardy-Weinberg proporcije

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1.$$

Ukoliko se hromozomi, kao intaktni, prenose sa roditelja na potomstvo, markeri koji su međusobno blisko postavljeni na istom hromozomu, naslediće se zajedno, odnosno oni pokazuju genetičku povezanost (*genetic linkage*). Za markere koji se nalaze na različitim hromozomima i prenose na potomstvo nezavisno jedan od drugog (nisu međusobno povezani), kaže se da su u *linkage equilibrium-u*. Suprotno od toga, markeri koji poseduju genetičku povezanost i koji će se, unutar populacije, češće naći zajedno nego što se pretpostavlja, nalaze se u *linkage disequilibrium-u*.

U toku istrage krivičnog dela, na licu mesta se nailazi na tragove biološkog porekla (npr. krv, semena tečnost, dlake, itd.). U takvim tragovima, neretko je prisutna vrlo mala količina DNK, a ukoliko je i prisutna može biti degradirana, a samim tim manje podesna za utvrđivanje DNK profila. Pored toga, moguće je da se u jednom tragu nalaze uzorci DNK koji potiču od više osoba, tzv. mešoviti tragovi, koje je neophodno razdvojiti i identifikovati osobe od kojih potiču. Zbog svojih osobina, mikrosatelitski markeri su, tokom 90-tih godina, gotovo u potpunosti zamenili upotrebu drugih markera u forenzičkim laboratorijama. Poželjne osobine koje bi trebalo da sadrže mikrosatelitski markeri, su:^{101,102,103,104,105,106.}

- visoka moć diskriminacije (PD) od preko 90%, uz visoku heterozigotnost (HET) od preko 70%,

- da se nalaze na različitim hromozomima u odnosu na druge markere koji se istovremeno ispituju, kako bi došlo do nezavisnog nasleđivanja,
- da imaju mogućnost istovremene amplifikacije sa drugim markerima, uz visoku reproducibilnost i sigurnost dobijenih rezultata,
- da postoji mali procenat lažnih (*stutter*) produkata,
- da imaju nisku učestalost mutacija,
- da dužina alela iznosi između 90 i 500 bp.

Pronalazak i upotreba metode PCR u forenzičkim laboratorijama umnogome je doprinela mogućnostima da se iz vrlo male količine bioloških tragova, izdvoji neophodna količina DNK za uspešno identifikovanje osobe, od koje trag potiče. Teoretski podaci govore da je za uspešnu analizu dovoljan samo jedan molekul DNK.¹⁰⁷ Međutim, u praksi, za uspešnu analizu potrebna je količina od oko 100-500 pikograma (pg), što bi bilo ekvivalentno količini od oko 20-100 telesnih ćelija. Pri tome treba imati u vidu da su, u slučaju starijih tragova ili tragova sa degradiranom DNK, kraći fragmenti pogodniji za analizu.

2.4.1. Autozomalni STR markeri

Analiza DNK u oblastima identifikacije primenjuje se od kraja osamdesetih godina prošlog veka. Mogućnost njene primene zasniva se na pretpostavci da ne postoje dve osobe sa istim DNK profilom, osim jednojajčanih blizanaca. Da bi ova tvrdnja postala i nepobitna činjenica, bilo bi neophodno analizirati DNK profile čitave svetske populacije i na taj način potvrditi da zaista ne postoje dva ista genetska profila. S obzirom na to da je takav zadatak praktično nemoguće izvršiti, vrši se utvrđivanje stepena verovatnoće da je određena (osumnjičena) osoba ostavila biološki trag, odnosno da to nije učinila neka druga osoba. Ukoliko se DNK profil biološkog traga izuzetog sa lica mesta, poklapa sa DNK profilom ispitivane osobe, prelazi se na izračunavanje moći diskriminacije za svaki lokus, a na osnovu broja lokusa korišćenog komercijalnog kita, dolazi se do ukupne vrednosti moći diskriminacije. Broj dobijen preračunom, predstavljaće verovatnoću, iskazanu u procentima, da dve nesrodne, slučajno odabrane osobe, imaju identičan profil. Kao što je već ranije napomenuto, najpre je neophodno poznavati učestalost i raspored alela u populaciji iz koje potiče ispitivana osoba.

Podaci o frekvenciji i broju alela autozomalnih markera, dobijeni su u populacionoj studiji uzorka stanovništva Vojvodine.¹⁰⁸ Kao najinformativniji, izdvojeni su markeri D2S1338 i D18S51. Na osnovu zabeleženih frekvencija alela i vrednosti izračunatih statističkih parametara, zaključeno je da se analiza autozomalnih markera, pomoću *15 AmpFlSTR Identifiler* PCR komercijalnog kita, u našoj populaciji, može uspešno primeniti u oblastima kriminalistike i utvrđivanja srodničkih odnosa.

2.4.2. Amelogenin

Pol osobe moguće je utvrditi pomoću analize Amelogenina, gena koji je odgovoran za sintezu proteina zubne gleđi. Ovaj marker obično se nalazi u sklopu komercijalnih kitova za analizu mikrosatelitskih markera i ispituje se zajedno sa njima.^{109,110} Na X hromozomu postoji delecija 6 parova nukleotida, usled čega je ovaj analizirani fragment DNK kraći na X, u odnosu na Y hromozom, što daje mogućnost njihovog razlikovanja na elektroferogramu. Pored toga, kod analize DNK ženske osobe, na elektroferogramu pojaviće se samo jedan pik, koji predstavlja X hromozom, dok će se kod muške osobe pojaviti dva pika, manji za X i veći za Y hromozom.

2.4.3. Y-STR markeri

Analiza mikrosatelitskih markera smeštenih na Y hromozomu, može se primeniti u više različitih oblasti istraživanja, npr. oblastima kliničke genetike, migratornim, evolutivnim, genealoškim i drugim oblastima. Međutim, ova metoda uglavnom se primenjuje u oblastima sudske medicine, konkretnije, prilikom utvrđivanja spornih srodničkih odnosa i u kriminalistici.

Pre pojave mikrosatelitskih markera, utvrđivanje očinstva baziralo se na prilično nepouzdanim analizama ABO, Rh i MN krvnih grupa, pomoću kojih se mogla samo isključiti muška osoba kao potencijalni biološki otac deteta, ali se nije moglo i dokazati da on to zaista jeste. Ispitivanjem HLA sistema napredovalo se u tom smislu, ali je tek pojavom analize STR markera dokazivanje očinstva dovedeno na verovatnoću od oko 99,9999%.

U oblastima kriminalistike, analiza Y-STR markera pokazala se kao značajna metoda prilikom analiziranja tzv. mešovityh tragova, odnosno bioloških tragova u kojima su prisutni molekuli DNK dve ili više osoba, koje mogu biti i različitog pola. U

slučajevima seksualnih delikata, npr. kod silovanja, potrebno je identifikovati počinioca, koji je, najčešće, muškog pola. Analizom autozomalnih STR markera može doći do preklapanja i maskiranja pikova na elektroferogramu, a samim tim i nemogućnosti utvrđivanja DNK profila muške osobe, odnosno sigurne identifikacije počinioca. Primena Y-STR markera u ovakvim situacijama omogućuje da se izvrši vezivanje i ispitivanje lokusa koji potiču isključivo od muške osobe, čime se vrlo lako dolazi do željene identifikacije počinioca krivičnog dela.

U našoj sredini, vršena je populaciona studija mikrosatelitskih markera smeštenih na Y hromozomu¹¹¹, kojom su dobijeni podaci o frekvenciji alela i haplotipova u populaciji Vojvodine. Izračunati forenzički statistički parametri pokazali su da se, na teritoriji Vojvodine, Y mikrosatelitski markeri mogu uspešno primeniti u forenzičke svrhe, odnosno u oblasti kriminalistike i pri utvrđivanju srodničkih odnosa. Poređenjem podataka ove studije, sa populacionim podacima drugih regija, došlo se do zaključka da ne postoji statistički značajna razlika između karakteristika pomenutih markera u populaciji Vojvodine, u odnosu na populacije Rumunije, Hrvatske i uzorka stanovništva Beograda. S druge strane, statistički značajna razlika zabeležena je u odnosu na populaciju Mađarske.

2.4.4. Mitohondrijska DNK

Mitohondrijska DNK specifična je po tome što se, u zavisnosti od vrste tkiva, nalazi u velikom broju kopija unutar ćelije (shodno broju mitohondrija). Tako se, npr. u ćelijama kože, sluzokože ili vagine nalazi oko 1000 mitohondrija po jednoj ćeliji, a moguće je da broj molekula DNK, po jednoj ćeliji, premašuje i nekoliko hiljada.¹¹² Upravo zbog toga, analiza mitohondrijske DNK vrši se u slučajevima kada je u biološkom uzorku prisutna veoma mala količina DNK, ili su ti uzorci stari i degradirani (npr. stari skeleti, nokti, kosa). Pored toga, važna osobina mitohondrijske DNK je i to što se nasleđuje isključivo po materinskoj liniji. Razlog za ovakav tip nasleđivanja leži u činjenici da, prilikom oplodnje, u jajnu ćeliju ulazi samo glava spermatozoida, koja ne sadrži mitohondrije, a vrat i rep spermatozoida, koji sadrže mitohondrije, ostaju van jajne ćelije. Usled navedenog, analiza mitohondrijske DNK može se koristiti za identifikaciju nepoznate ženske osobe upoređivanjem njenog DNK profila, sa DNK profilima srodnika sa majčine strane.

Zahvaljujući analizi polimorfizma mitohondrijske DNK, izvršenoj u populaciji Vojvodine¹¹³, otkrivene su mtDNK sekvence i svrstane u odgovarajuće haplogrupe. Takođe, određene su i frekvencije ovih haplogrupa. Njihovim poređenjem sa populacionim studijama drugih regija, utvrđeno je da mitohondrijski genetski materijal stanovništva Vojvodine ima više sličnosti sa drugim populacijama Južne Evrope, a da istovremeno poseduje kombinacije mtDNK podgrupa i zasebne tipove sekvenci koji su karakteristični, pre svega za populacije Srednje i Istočne Evrope. Praćenjem podudarnosti i razlika haplotipova i učestalosti njihovog javljanja u različitim populacijama, može se doći do određenih zaključaka o velikim svetskim migracijama ljudi, što predstavlja još jednu, od širokog spektra oblasti, u kojima analiza mikrosatelitskih markera može naći svoju primenu.

2.5. METODE I TEHNOLOGIJE ANALIZE DNK

2.5.1. Tehnike izolacije DNK

Za izolaciju DNK, iz uzoraka sakupljenih sa lica mesta, mogu se koristiti različite metode. Izbor metode zavisi od više faktora, pre svega vrste i količine biološkog materijala, potrebne brzine i mogućnosti automatizacije ekstrakcije, statistički dokazane efikasnosti u radu sa forenzičkim uzorcima, vrste korištenih hemikalija, cene postupka, kao i obučenosti stručnog tima.^{114,115,116,117,118} Spekter mogućih tehnika podrazumeva jednostavnu alkalnu lizu, neutralizaciju,¹¹⁹ dobro poznatu metodu isoljavanja (salting-out)¹²⁰ koja se u koristi u slučajevima veće koncentracije ćelija u uzorku, kao i praktičnu metodu koja se vrši u zatvorenoj epruveti, uz dodavanje termostabilne proteinaze.¹¹⁷ Samo neke od metoda pogodne su za automatizaciju. Mnoge metode, prilikom izolacije, povezane su sa mogućnošću kontaminacije DNK, a pored toga, zahtevaju i dodatne postupke centrifugiranja i odstranjivanja rastvarača,^{121,122} te ih nije lako prilagoditi za automatizaciju. Standardi, za optimalan proces izolacije DNK, jesu visok prinos DNK, brzina izvođenja procesa¹²³ i visok kvalitet izolovane DNK.^{124,125} Većina metoda za izolaciju DNK ispunjava samo po jedan od navedenih standarda za optimalan izolacioni proces. Upravo zbog toga, za analizu u forenzičke svrhe, dugo vremena se, kao metoda izbora, koristila tradicionalna, ali istovremeno i štetna, fenol-hloroform ekstrakcija DNK, koja se morala vršiti uz poštovanje strogih mera bezbednosti. Finalni produkt ekstrakcije ponekad nije bio dovoljno kvalitetan, te je morao biti podvrgnut daljim koracima prečišćavanja, tako da ni ovaj metod nije bio u potpunosti idealan.

Izolacija jedarne DNK

Bez obzira o kom protokolu izolacije DNK se radi, prvi korak predstavlja liza ćelije, odnosno ćelijske membrane, kako bi se došlo do molekula DNK. Iako se DNK može izolovati termičkom hidrolizom¹²⁶, ovom suviše grubom metodom razaranja ćelija, neće se dobiti DNK zadovoljavajućeg kvaliteta i čistoće, koja bi se mogla dalje koristiti u tehnikama analiziranja, kao npr. u amplifikaciji reakcijom PCR. DNK dobijena ovom metodom, nije u zadovoljavajućoj meri odvojena od strukturnih elemenata i vezanih proteina, a ove nečistoće kompromituju dalje procedure. Za dobijanje kvalitetne DNK,

fosfolipidna ćelijska i nuklearna membrana se moraju razložiti procesom lize, upotrebom tzv. lizirajućeg pufera (lysis buffer). Lizirajući pufer često sadrži natrijum dodecil sulfat, koji rastvara lipide, a samim tim prekida kontinuitet membrane. Takođe, pufer održava nivo pH vrednosti konstantnim, čime utiče na stabilnost molekula DNK. DNK je negativno naelektrisana usled fosfatnih grupa prisutnih u svojoj strukturi, te je njena rastvorljivost zavisna od pH vrednosti. Proteinaze, tj. enzimi koji razgrađuju proteine, dodaju se lizirajućem puferu radi odstranjivanja proteina vezanih za DNK, kao i razaranja ćelijskih enzima koji bi, u suprotnom, razgradili DNK oslobođenu nakon lize membrane. Pored navedenog, za uspešan proces liziranja, ponekad je neophodno zagrevanje i mućkanje uzoraka, kako bi se ubrzala enzimaska reakcija i rastvaranje lipida.

Prečišćavanje DNK

Ćelije ili uzorci tkiva mogu sadržati određene elemente, koji će inhibitorno delovati na proces izolacije DNK. Ovi elementi uglavnom deluju na sledeće načine u procesu izolacije DNK:

1. Ometaju sam proces liziranja ćelije,
2. Degradiraju nukleinske kiseline ili sprečavaju njihovu izolaciju nakon liziranja membrane,
3. Inhibišu aktivnost polimeraze tokom umnožavanja ciljne sekvence DNK reakcijom PCR.

Nakon inicijalne izolacije, DNK je neophodno odvojiti od drugih ćelijskih komponenti, koje su preostale nakon liziranja membrane. Obično se ovaj korak obavlja ispiranjem uzorka, čime se odstranjuju sve supstance koje bi mogle inhibitorno da utiču na proces amplifikacije reakcijom PCR. Postoji širok spektar poznatih inhibitora PCR reakcije, uključujući komponente telesnih tečnosti (hemoglobin, urea, melanin), hemijske reagense koji se koriste u kliničkim i forenzičkim laboratorijama (heparin, formalin, Ca^{2+}), organska i fenolna jedinjenja, glikogen, polisaharidi, mikroorganizmi i dr.¹²⁷ Mnoga od navedenih jedinjenja imaju rastvorljivost sličnu DNK, usled čega se ne otklanjaju u potpunosti tokom procesa izolacije, te zaostaju kao kontaminirajući elementi. Razvijeno je nekoliko metoda za odstranjivanje ovih zaostalih, inhibitornih produkata.^{127,128}

U forenzičkim laboratorijama koriste se tri osnovne tehnike ekstrakcije DNK:

1. Fenol-hloroform ekstrakcija (*Phenol - chloroform extraction*)

2. Heleks (*Chelex*) ekstrakcija i
3. Ekstrakcija u čvrstoj fazi na osnovu magnetnog afiniteta (*magnetic affinity solid - phase extraction*)

Standardni protokol za fenol-hloroform ekstrakciju, koji se i danas koristi, opisan je 1989.¹²¹ Pojedini protokoli uključuju i dodatne postupke prečišćavanja i koncentrovanja, čime se otklanjaju inhibitori slične rastvorljivost kao DNK, kao što su hem, indigo boje i dr. Fenol-hloroform ekstrakcija je vrlo pogodna za dobijanje dvostrukog lanca DNK velike molekulske mase. Međutim, proces je dugotrajan, podrazumeva upotrebu opasnih hemikalija, zahteva prebacivanje sadržaja u veći broj epruveta, kao i finalni korak taloženja, što povećava rizik kontaminacije. Uprkos tome, ova metoda je vrlo dobra za izolaciju DNK iz gotovo svih vrsta forenzičkih uzoraka i još uvek se koristi kao poslednje moguće sredstvo u izolovanju DNK iz "problematičnih" uzoraka, jer daje relativno visok prinos, visoko kvalitetne DNK, a visoka čistoća omogućava da DNK ostane stabilna tokom dužeg skladištenja.

Chelex[®] 100 je sačinjen od kopolimera stiren-divinilbenzena i jona iminodiacetata, i ima veliki afinitet ka jonima metala (Mg^{2+} i Ca^{2+}).¹²⁹ Vezujući ove jone i uklanjajući ih iz rastvora, dovodi do deaktivacije neželjenih enzima, kao npr. DN-aza. Pored ovog efekta, menja strukturu proteina ćelijske membrane, što najpre dovodi do destabilizacije čitave ćelije, a potom i liziranja membrane. Dodavanjem proteinaze K, koja razara deaktivirane enzime i strukturno izmenjene proteine, čitav proces dobija na brzini i kvalitetu. Proteinaza K se zatim samostalno deaktivira u narednom koraku izolacije, koji podrazumeva prokuvavanje na 100°C. Ova metoda izolacije počela je da se koristi u forenzičkim laboratorijama prema protokolu iz 1991.¹²² Jednolančana DNK dobijena ovom metodom izolacije, može se koristiti za analize tehnikom PCR. Još bolji rezultati dobijeni su ukoliko se primeni i inicijalni korak inkubacije, dodavanje proteinaze K, kao i inkubacija na 56°C tokom 2 časa, ili na 37°C preko noći. Velika prednost Chelex metode izolacije predstavlja brzina izvođenja i jednostavnost procesa, niska cena, rad sa hemikalijama manje štetnosti, kao i to što se čitav postupak odvija u jednoj epruveti, bez koraka koji zahtevaju prebacivanje sadržaja iz jedne u drugu epruvetu, što redukuje mogućnost kontaminacije. Iz navedenih razloga, Chelex metoda je vodeća metoda ekstrakcije DNK iz forenzičkih uzoraka.^{122,130} S druge strane, da bi se dobio kvalitet DNK poput kvaliteta dobijenog metodom fenol-hloroform ekstrakcije, neophodni su dodatni koraci prečišćavanja.

Ekstrakcija u čvrstoj fazi (*solid-phase extraction* - SPE) u upotrebi je već više godina unazad. U suštini, ova tehnika predstavlja proces kojim se jedinjenja, rastvorena ili suspendovana u tečnoj smeši, odvajaju od drugih jedinjenja, na osnovu fizičkih i hemijskih karakteristika. Naprednija varijanta ove tehnike zasniva se na vezivanju DNK za silikatnu površinu, odnosno površinu absorbensa, koja se nalazi na paramagnetnim kuglicama, a sve odvija u prisustvu haotropnih rastvora. Kuglice se, zajedno sa DNK vezanom za površinu kuglica, prikupe dejstvom magnetne sile, a ostaci liziranih ćelija, proteini i dr. se odstranjuju iz rastvora. Kuglice sa DNK se zatim resuspenduju, u više koraka prečišćavanja, kako bi se dobila što je moguće kvalitetnija DNK. Prema tome, izolacija se može izvršiti u jednoj epruveti, dodajući ili oduzimajući rastvore, tako da se nečistoće odstranjuju, a DNK ostaje vezana za kuglice, dok se, na kraju, i ona ne odvoji i koristi za dalje analize. Ova tehnika poseduje određene prednosti u odnosu na prethodne dve, a to je:

- nekorišćenje štetnih organskih rastvarača,
- nekorišćenje koraka taloženja, centrifugiranja i sušenja kuglica,
- brzo prečišćavanje,
- odstranjivanje gotovo svih inhibirajućih elemenata,
- dobijanje visoko kvalitetne jednolančane DNK,
- reproducibilna ekstrakcija sa merljivim rezultatima,
- pogodna za modifikovanje.

2.5.2. PCR metoda

Metoda lančane reakcije polimeraze (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) sastoji se u oponašanju prirodnog procesa replikacije, u strogo kontrolisanim, laboratorijskim uslovima (Slika 17). Nakon izolacije DNA, u reakcionu smešu se dodaju slobodni nukleotidi, od kojih će biti sintetisani novi lanci, komplementarni lancima izolovane DNK, zatim termostabilna polimeraza *TaqPoly* - enzim koji će vršiti elongaciju novih lanaca, kao i set prajmera, neophodnih za inicijaciju replikacije, koja započinje njihovim vezivanjem za odabrana mesta u genomu. Pomoću aparata, vrše se ciklične promene temperature u reakcionoj smeši. Proces započinje zagrevanjem uzorka na oko 94°C, radi kidanja vodoničnih veza između komplementarnih lanaca DNK. Temperatura se zatim snižava na oko 58°, kada se prajmeri, kratki komplementarni segmenti DNK, vezuju za

odabrane segmente jednolančane DNK, označavajući na taj način deo molekula koji će biti replikovani. Nakon toga, temperatura se podiže na oko 72°, na kojoj DNK polimeraza vrši elongaciju novih lanaca DNK. Svaki od ovih koraka traje, približno, po 1 minut. S obzirom na to da se proces istovremeno odvija na oba lanca, nakon svakog ciklusa, dobija se dvostruko veća količina DNK. Nakon tridesetak ciklusa, dobijena količina DNK, teorijski, veća je i do milijardu puta od početne. Međutim, u praksi, postiže se nekoliko desetina miliona puta veća količina DNK.¹³¹



Slika 17. PCR aparat *Thermal Cycler 9700*

Mentype Argus X-12

Na tržištu postoji više komercijalnih kompleta, koji se koriste za analizu mikrosatelitskih markera autozomalnih i polnih hromozoma. *Mentype Argus X-12 PCR Amplification Kit* predstavlja jedan od njih, a namenjen je za multipleks analizu mikrosatelitskih markera smeštenih na X hromozomu. U njemu se, pored prajmera za Amelogenin, nalaze i prajmeri za sledećih 12 lokusa: DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10079, DXS10101, DXS10103, DXS10134, DXS10135, DXS10146, DXS10148 i HPRTB (Tabela 6).

Prajmeri su obeleženi fluorescentnim bojama (plavom, zelenom, žutom i crvenom), te će se i dobijeni pikovi na elektroferogramu razlikovati, osim po veličini, i po navedenim bojama. Za uspešno izvršene analize, prema podacima proizvođača, optimalno je uzeti po 0,2-0,5 nanograma (ng) DNK, iako je donja granica detekcija oko 100 pikograma (pg) DNK. Ovaj kit testiran je na PCR aparatu *GeneAmp 9700 thermal*

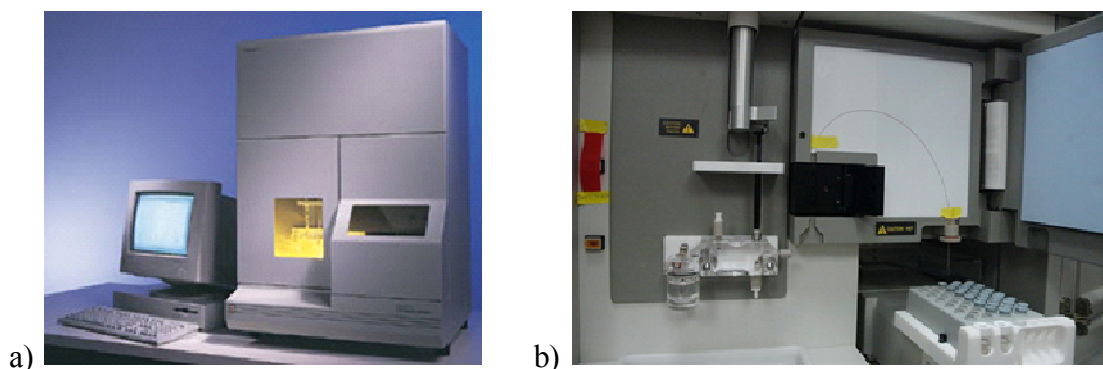
cycler, kao i na instrumentima za kapilarnu elektroforezu *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* i *ABI PRISM 3100/3130 Genetic Analyzer*.

Tabela 6. Lokus-specifične informacije Argus X-12 Kita

Lokus	Ponovljen motiv	Ref. alel	Opseg alela
Amelogenin X	–	–	–
Amelogenin Y	–	–	–
DXS7132	[TCTA]13	13	8–20
DXS7423	[TCCA]3 TCTGTCCT [TCCA]12	15	8–19
DXS8378	[CTAT]12	12	7–15
DXS10074	[AAGA]14	14	4–21
DXS10079	[AGAG]3 TGAAAGAG [AGAA]17 AGAG [AGAA]3	21	14–25
DXS10101	[AAAG]3 GAAAGAAG [GAAA]3 A [GAAA]4 AAGA [AAAG]5 AAAAAAGAA [AAAG]13 AA	28.2	24–38
DXS10103	[TAGA]2 CTGA [CAGA][TAGA]11[CAGA]4[TAGA]	19	15–21
DXS10134	[GAAA]3 GAGA [GAAA]4 AA [GAAA] GAGA [GAAA]4 GAGA [GACAGA]3 [GAAA] GTAA [GAAA]3 AAA [GAAA]4 AAA [GAAA]15	35	28–46.1
DXS10135	[AAGA]3 GAAAG [GAAA]20	23	13–39.2
DXS10146	[TTCC]3 T [TTCC]3 TTTC CTCCCTCC [TTCC] [TCCC] TTCTTCTTTC [TTCC]2 TTTCTT [CTTT]2 CTTC [CTTT]10 T [CTTT]2	26	24–46.2
DXS10148	[GGAA]4[AAGA]12[AAAG]4 N8 [AAGG]2	22	13.3–38.1
HPRTB	[AGAT]12	12	6–19

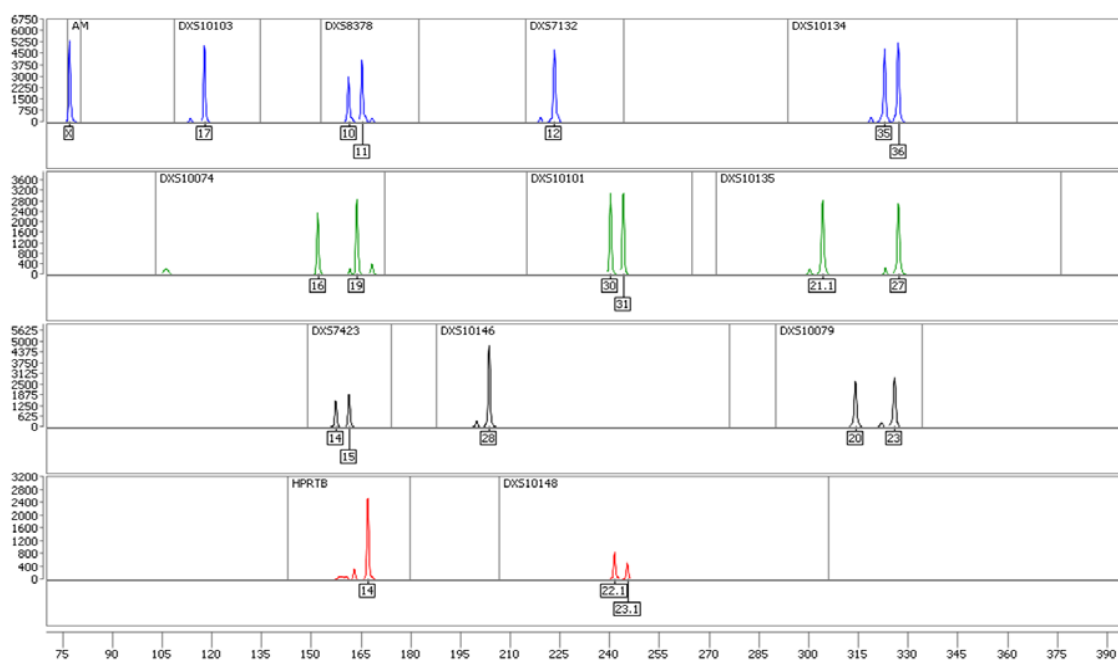
2.5.3. Kapilarna elektroforeza

Nakon amplifikacije, neophodno je izvršiti razdvajanje i detekciju dobijenih umnoženih, mikrosatelitskih produkata. Produkti moraju biti razdvojeni tako, da se svaki alel, pojedinačno, može razlikovati, iako je ponekad razlika između pojedinih alela u samo jednom baznom paru. Raniji načini za detekciju uključivali su radioaktivno obeležavanje i autoradiografiju. Iako su ove metode bile dovoljno senzitivne, oduzimale su više vremena i bile ekonomski manje isplative usled korišćenja fotografskih filmova i druge opreme, kao i poštovanju strogih uslova za odlaganje radioaktivnih materija. Potom su se, krajem prošlog veka, počele koristiti metode za detekciju produkata na bazi gel elektroforeze i bojenja srebrom.^{132,133} Pozitivna strana metode bojenja srebrom bila je to što je ekonomski vrlo isplativa. Međutim, negativna strana podrazumevala je nemogućnost razlikovanja alela koji su iste dužine, a smešteni na različitim lokusima. Upravo zbog ovog problema, uvedeno je obeležavanje PCR produkata različitim bojama, čime je omogućeno uspešno razlikovanje alela istih dužina. Prajmeri, koji se nalaze u sklopu gotovo svih komercijalnih kitova za istraživanje mikrosatelitskih markera i koriste za obeležavanje željenog segmenta DNK, obeleženi su fluorescentnim bojama. Detekcija tako obeleženih PCR produkata, u modernijim laboratorijama, vrši se instrumentima za kapilarnu elektroforezu, kao što su npr. *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer*, (Slika 18) *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer*, *ABI PRISM 3700 Genetic Analyzer*, koji u zavisnosti od broja kapilara, mogu da analiziraju i preko 48, 1000, odnosno 4000 uzoraka DNK, u toku jednog dana.^{134,135,136,137}



Slika 18. a) Spoljašnji i b) unutrašnji izgled aparata *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer*

Tehnologija metode kapilarne elektroforeze zasniva se na upotrebi vrlo tanke, staklene kapilare, dužine oko 25-75 cm, ispunjene polimerom kroz koji se kreću fragmenti DNK. Nailaskom fragmenta na snop lasera, on biva prekinut, što se registruje kao pik na elektroferogramu (Slika 19), odnosno na računaru koji dolazi u kompletu sa aparatom za kapilarnu elektroforezu. Kraći fragmenti kreću se brže kroz polimer, brže nailaze na laserski snop, a samim tim će se nalaziti u početnom delu elektroferograma, ispred dužih fragmenata. Zatim se dobijeni fragmenti upoređuju sa fragmentima poznatih dužina, tzv. standardima, i iz odgovarajućih tablica očitava o kom alelu se radi za dati lokus.



Slika 19. Prikaz elektroferograma

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Izrada populacione studije, iz koje će se izračunati broj i frekvencija alela na svakom ispitivanom lokusu.
2. Utvrđivanje strukture i frekvencije haplotipova.
3. Utvrđivanje vrednosti forenzički relevantnih parametara X-STR markera (polimorfnost, heterozigotnost, moć isključivanja, moć diskriminacije za ženske i muške osobe, prosečna šansa isključivanja).
4. Ocena mogućnosti primene analize X-STR markera u slučajevima iz oblasti medicinske kriminalistike, humane identifikacije i veštačenja spornih srodničkih odnosa u populaciji Vojvodine.
5. Poređenje dobijenih rezultata sa rezultatima drugih populacionih studija i određivanje genetičke bliskosti između populacija.
6. Postavljanje osnova za dalja istraživanja u populaciono-genetičkim, antropološkim, demografskim i drugim oblastima.

4. RADNA HIPOTEZA

Dosadašnja ispitivanja mikrosatelitskih markera X hromozoma, sprovedena u drugim zemljama, ukazuju da analize navedenih markera predstavljaju pogodno sredstvo za rešavanje slučajeva iz oblasti kriminalistike, humane identifikacije i veštačenja spornih srodničkih odnosa.

Na osnovu toga, polazi se od pretpostavke, da X-STR markeri, u populaciji Vojvodine, poseduju visoke vrednosti forenzički relevantnih parametara, odnosno da imaju relativno visok broj različitih alela (5-12 po lokusu), visok procenat heterozigotnih osoba (30-90% u zavisnosti od lokusa), visoke vrednosti verovatnoće isključenja (30-80% po lokusu), visoke vrednosti moći diskriminacije (25-95% po lokusu) i generalno visok stepen polimorfizma, odnosno informativnosti (PIC 0,3-0,85 po lokusu).

Očekuje se da dobijeni rezultati ukažu na nižu genetičku distancu u odnosu na geografski bliske populacije, odnosno na višu genetičku distancu u odnosu na udaljenije populacije.

Takođe, poznavanje varijabilnosti ispitivanih markera, uz korišćenje odgovarajućih statističkih metoda, omogućila bi primenu analize X vezanih mikrosatelitskih lokusa, u medicinskoj kriminalistici, u cilju humane identifikacije i u veštačenjima spornih srodničkih odnosa među stanovništvom Vojvodine.

5. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je izvršeno u Centru za sudsku medicinu, toksikologiju i molekularnu genetiku, u Novom Sadu, u vidu prospektivne studije, tokom 2012. i 2013. godine.

5.1. MATERIJAL

Uzorci venske krvi, uzeti su od 200 odraslih, međusobno nesrodnih osoba, oba pola (175 muškaraca i 25 žena), obdukovanih u Centru za sudsku medicinu, toksikologiju i kliničku genetiku u Novom Sadu, čija se poslednja adresa stanovanja nalazi na teritoriji Vojvodine. Trajne krvne mrlje, načinjene su na FTA-karticama (impregnirana hartija na kojoj se lizira membrana ćelije, a DNK vezuje za matriks hartije).

5.2. METODE

5.2.1. Izolacija jedarne DNK

Izolacija DNK materijala iz krvnih mrlja vršena je *Chelex* metodom¹²², u DNK laboratoriji, prema sledećem protokolu

1. Komadić trajne krvne mrlje veličine oko 0,3 x 0,3 cm inkubira se u plastičnoj epruveti zapremine 1,5 ml, sa 1 ml dejonizovane vode, tokom 30 minuta, na sobnoj temperaturi
2. Uzorak se vorteksira 5 sekundi na 1000 obrtaja, a zatim centrifugira 3 minuta na 13.000 obrtaja u minuti
3. Iz epruvete se otpipetira 980 µl supernatanta
4. U epruvetu se doda 160 µl 5% *Chelex* 100 reagensa, vorteksira i ostavi preko noći u vodenom kupatilu na 56°C
5. Vorteksira se 5 sekundi na 1000 obrtaja, a zatim vrati u vodeno kupatilo na 100°C tokom 8 minuta
6. Vorteksira se 5 sekundi na 1000 obrtaja, pa centrifugira 3 minuta na 13000 obrtaja u minuti

7. U novu plastičnu epruvetu se otpipetira 30 μ l supernatanta, razblaži sa 120 μ l dejonizovane vode i dobijen sadržaj koristi za dalju analizu.

5.2.2. Amplifikacija DNK

Amplifikacija dobijenih uzoraka DNK, vršena je metodom PCR, uz korišćenje komercijalnog *Mentype*[®] *Argus X-12 PCR Amplification Kit* - a, proizvođača *Biotype AG, Dresden, Germany*, prema uputstvu proizvođača.

MasterMix je sačinjen prema sledećem protokolu:

1. 15,9 μ l dejonizovane vode
2. 5 μ l reakcione smeše
3. 2,5 μ l prajmera
4. 0,6 μ l DNK polimeraze.

U plastičnu epruvetu zapremine 0,2 ml, dodaje se po 1 μ l izolovanog uzorka DNK i 24 μ l MasterMix-a. Epruvete se postavljaju u aparat *Thermal Cycler 9700* proizvođača *Applied Biosystems*, u kojem se ciklične promene temperature vrše na sledeći način:

1. Inicijalno zagrevanje na 94°C u trajanju od 4 minuta radi aktivacije DNK polimeraze
2. Na 96°C u trajanju od 30 sekundi
3. Na 63°C u trajanju od 120 sekundi
4. Na 72°C u trajanju od 75 sekundi
5. Prethodna tri koraka (2-4) ponavljaju se u 5 ciklusa, a zatim
6. Na 94°C u trajanju od 30 sekundi
7. Na 60°C u trajanju od 120 sekundi
8. Na 72°C u trajanju od 75 sekundi
9. Prethodna tri koraka (6-8) ponavljaju se u 25 ciklusa
10. Uzorci se potom drže na 68°C u trajanju od 60 minuta radi finalne ekstenzije lanca
11. Čuvaju se na 10°C do uzimanja u dalji rad.

5.2.3. Detekcija produkata amplifikacije

Nakon završetka PCR reakcije, uzima se po 1 μ l PCR produkta i 12 μ l formamida, uz dodatak 0,5 μ l standarda (*DNA SizeStandard 550* (BTO)). Razdvajanje dobijenih fragmenata izvodi se kapilarnom elektroforezom na aparatu *ABI Prism 310 Genetic Analyzer*, korišćenjem *ABI Prism 310 Data Collection softvera*.

Za interpretaciju dobijenih rezultata korišten je *GeneScan* i *Genotyper* program, sa 3.7 verzijom softvera.

5.2.4. Statistička obrada podataka

Nakon detekcije i razvrstavanja dobijenih rezultata, odnosno DNK profila, izvršeno je izračunavanje opštih genetičkih, statističkih parametara. Utvrđivanje frekvencije alela izvršeno je direktnim prebrojavanjem, i to zasebno kod osoba muškog, a zatim i ženskog pola. Za podatke iz muškog dela populacije izračunate su i frekvencije haplotipova. Dobijene frekvencije, dodatno su proverene pomoću programa *Arlequin* verzije 3.5 i *GENEPOP* verzije 4.2.

S obzirom na to da je u sprovedenom istraživanju analiziran manji broj ženskih osoba, upotrebljen je *Exact test* radi utvrđivanja eventualnog postojanja statistički značajne razlike između frekvencije alela u muškoj i ženskoj populaciji. Ukoliko razlike u frekvenciji alela ne bi bile statistički značajne, u daljem radu bi se mogla posmatrati ukupna frekvencija alela, a ne frekvencija svakog pola zasebno. Pored toga, *Exact* testom je provereno da li među lokusima postoji pojava *linkage disequilibrium*-a. Za uzorak ženskog dela populacije izvršena je provera da li se populacija nalazi u *Hardy-Weinberg*-ovoj ravnoteži. Matematičke formule za *Exact* test i *Hardy-Weinberg*-ovu ravnotežu nalaze se u sklopu *Arlequin* programa, tako da su ovim programom i izvršene pomenute statističke analize.

Nakon izračunavanja opštih genetičkih, statističkih parametara, izračunati su i sledeći forenzički statistički parametri:

- *Polymorphism information content* (PIC) - parametar koji pokazuje koliko je određeni marker polimorfan, odnosno informativan, a čije vrednosti rastu sa povećanjem broja alela na lokusu i njihovim ujednačenijim frekvencijama.
- Stepen heterozigotnosti (HET) predstavlja procenat heterozigotnih osoba - veći stepen heterozigotnosti rezultuje većom varijabilnošću.

- *Power of exclusion* (PE), odnosno moć isključivanja - verovatnoća da će muška osoba koja nije biološki otac deteta biti isključen na osnovu rezultata za određeni lokus.
- *Paternity index* (PI), odnosno index očinstva - verovatnoća da je ispitana muška osoba biološki otac deteta u odnosu na mušku osobu, izabranu metodom slučajnog izbora.
- *Power of discrimination of man and female* (PDM i PDF), odnosno moć diskriminacije za muške i ženske osobe - verovatnoća da će dve osobe, izabrane metodom slučajnog izbora, imati različit genotip na određenom lokusu.
- *Mean exclusion chance* (MEC), odnosno prosečna vrednost isključivanja - verovatnoća da će dve osobe, izabrane metodom slučajnog izbora, imati identičan genotip na određenom lokusu.

Pomenuti parametri, PIC, HET, PE, PI, PDM, PDF i MEC, izračunati su korišćenjem statističkog programa i formula^{75,76,77,138,139} dostupnim za slobodnu upotrebu na stranici sajta www.chrx-str.org⁹¹ (Slika 20).

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

$$I \quad \sum_i f_i^3 (1 - f_i)^2 + \sum_i f_i (1 - f_i)^3 + \sum_{i < j} f_i f_j (f_i + f_j) (1 - f_i - f_j)^2$$

$$II \quad \sum_i f_i^3 (1 - f_i) + \sum_i f_i (1 - f_i)^2 + \sum_{i < j} f_i f_j (f_i + f_j) (1 - f_i - f_j)$$

$$III \quad 1 - \sum_i f_i^2 + \sum_i f_i^4 - \left(\sum_{i < j} f_i^2 \right)^2$$

$$IV \quad 1 - 2 \sum_i f_i^2 + \sum_i f_i^3$$

$$V \quad 1 - 2 \left(\sum_i f_i^2 \right)^2 + \sum_i f_i^4$$

$$VI \quad 1 - \sum_i f_i^2$$

Slika 20. Formule za preračunavanje forenzičkih statističkih parametara

- I. MEC formula po Krugeru, koja se koristi za autozomalne STR markere, kao i X-STR markere kada se analiziraju dete, majka i majka pretpostavljenog oca.
- II. MEC formula po Kishidi, koja se koristi za X-STR markere kada se analiziraju žensko dete, majka i potencijalni otac.
- III. MEC formula po Desmaraisu, koja se koristi za X-STR markere kada se analiziraju žensko dete, majka i potencijalni otac.

- IV. MEC formula po Desmaraisu, koja se koristi za X-STR markere kada se analiziraju otac i ćerka ili majka i sin.
- V. Formula za izračunavanje PD za osobe ženskog pola.
- VI. Formula za izračunavanje PD za osobe muškog pola.

Exact test je upotrebljen radi utvrđivanja eventualnog postojanja statistički značajne razlike između frekvencije alela pojedinačnih lokusa populacije Vojvodine, u odnosu na populacije drugih zemalja.

Za vizuelizaciju interpopulacionih genetičkih odnosa, pomoću programa POPTREE2¹⁴⁰ konstruisani su dendrogrami. Pouzdanost nodusa dendrograma određena je bootstrap analizom sa 1000 permutacija. Kao ulazni parametar u konstruisanju dendrograma, uzete su izračunate Fst vrednosti genetičke diferencijacije.¹⁴¹ Genetička diferencijacija između parova populacija definisana je kao niska ukoliko su Fst vrednosti manje od 0,05. Fst vrednosti u opsegu od 0,05 do 0,15 ukazuju na srednji nivo diferencijacije između populacija. Visok nivo diferencijacije populacija je određen Fst vrednostima u opsegu od 0,15 do 0,25, dok na veoma visoku diferencijaciju ukazuju Fst vrednosti veće od 0,25.¹⁴²

Dobijene vrednosti genetičke diferencijacije iskorištene su i implementirane i u koordinatnu analizu (*Principal Coordinate Analysis - PCoA*) programskog paketa GenALEX 6.5.¹⁴³ PCoA analiza je takođe jedna od metoda vizualizacije genetičkih odnosa između ispitivanih populacija i omogućava pregledan prikaz i laku interpretaciju velikog broja obrađenih podataka. U suštini, predstavlja prikaz podataka u koordinatnom sistemu, u čijem centru se nalaze glavne koordinatne ose varijacije. Prve dve, eventualno tri koordinate, otkrivaju većinu varijacija, kao i moguće grupisanje populacija, pri čemu svaka naredna pridodata koordinata ukazuje na proporcionalno manje varijacija u odnosu na ukupnu količinu varijacija.

6. REZULTATI

Dobijeni rezultati su, radi preglednosti, predstavljeni tabelarno i grafički. U Tabeli 7. prikazani su DNK profili svih 200 analiziranih osoba. U tabelama 8, 9, 10 i 11 date su frekvencije haplotipova, koje su mogle biti računane samo za muški deo populacije. Na kraju su, pojedinačno za svaki lokus, prikazani broj i frekvencije alela, kao i izračunati opšti i forenzički statistički parametri.

Frekvencije alela najpre su izračunate posebno za muški i posebno za ženski deo populacije (Tabela 7). Analizom ženskog dela populacije, utvrđeno je da se populacija nalazi u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži. Pomoću *exact* testa i Bonferonijeve korekcije, izvršeno je poređenje ove dve populacije, čime je ustanovljeno da ne postoji statistički značajna razlika u frekvenciji alela između muških i ženskih osoba, te su podaci za mušku i žensku populaciju objedinjeni i prikazani za celokupni uzorak.

Exact testom sa Bonferonijevom korekcijom utvrđeno je da ne postoji povezanost pojedinih lokusa prilikom nasleđivanja, odnosno nema pojave *linkage disequilibrium*-a.

6.1. PRIKAZ ALELA KOMPLETNOG UZORKA

Tabela 7. Aleli 12 analiziranih lokusa, u uzorku od 175 muških i 25 ženskih osoba populacije Vojvodine

	DXS10103	DXS8378	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135	DXS7423	DXS10146	DXS10079	HPRTB	DXS10148
M1	18	11	15	35	9	32	28	14	28	19	12	18
M2	19	11	15	37	18	28.2	25	17	29	20	8	25.1
M3	19	11	15	38.3	8	32.2	17	16	30	18	13	22.1
M4	16	11	15	35	16	30.2	20	15	28	22	12	25.1
M5	18	10	13	36	18	29.2	24	14	31	21	12	25.1
M6	18	10	14	40.3	18	30.2	22	15	42.2	20	9	24.1
M7	19	11	14	36	19	28.2	31	15	39.2	15	13	26.1
M8	17	12	14	35	15	32	21	14	28	19	12	18
M9	17	12	14	36	7	31.2	21	14	28	19	10	26.1
M10	20	11	14	34	8	28.2	19	16	30	21	11	28.1
M11	19	11	15	35	17	31.2	22	15	26	20	11	24.1
M12	19	10	16	35	16	30.2	21	15	26	17	15	24.1
M13	18	10	14	36	8	29.2	26	15	40.2	22	9	23.1
M14	19	11	14	36	8	31.2	20	15	26	20	14	24.1
M15	20	12	17	35	15	30.2	16	15	26	19	13	24.1
M16	18	9	13	35	16	28.2	22	15	27	21	12	24.1
M17	20	10	13	35	19	30.2	19	14	29	21	10	18
M18	16	10	14	37	18	31	22	14	42.2	20	12	26.1
M19	18	11	16	40.3	15	32	20	14	45.2	17	12	23.1
M20	18	10	13	38	16	31.2	24	13	26	20	14	26.1
M21	20	10	15	37	16	31.2	23	15	28	17	15	25.1
M22	19	11	14	37	8	30.2	23	15	46.2	16	12	27.1
M23	18	10	14	36	8	27.2	22	14	27	20	12	29.1
M24	19	10	14	35	7	28.2	21.1	16	28	19	12	28.1
M25	19	11	14	36	17	27.2	25	15	26	20	12	30.1
M26	19	11	15	36	16	32.2	22	14	27	19	13	25.1
M27	19	10	15	43.3	8	33	17	15	24	17	13	20
M28	18	10	13	35	17	30	28	14	29	20	13	25.1
M29	20	12	15	33	8	30.2	19	15	45.2	17	14	18
M30	19	10	13	35	18	31.2	26	17	30	20	12	24.1
M31	18	10	13	36	8	31.2	24	14	41.2	17	13	25.1
M32	19	10	14	40.3	18	32	21	14	30	19	15	26.1
M33	16	9	15	37	18	28.2	23	15	28	18	13	23.1
M34	20	11	14	36	18	31.2	19	14	26	21	13	18
M35	19	12	15	33	7	32	23	13	28	21	12	19
M36	14	11	13	36	17	31.2	18	15	26	19	12	23
M37	19	11	14	39.3	18	27.2	20	14	39.2	17	13	24.1
M38	19	10	14	38	8	27.2	20	13	42.2	20	12	28.1
M39	18	12	14	37	16	31	20	15	39.2	13	13	25.1

M40	21	13	17	42.3	18	32	27	14	28	20	13	19
M41	19	11	13	35	17	28.2	24	16	29	21	13	26.1
M42	19	11	14	40.3	8	31	21	14	39.2	17	15	27.1
M43	19	10	13	40.3	17	33	26	14	29	21	13	26.1
M44	18	10	15	34	15	32.2	20	16	44.2	19	13	25.1
M45	19	11	13	38.3	20	30	30	15	27	18	14	23.1
M46	19	10	14	36	16.2	31	21	14	28	19	13	26.1
M47	18	11	13	34	20	29.2	28	17	33.2	19	13	29.1
M48	18	10	12	34	17	30.2	20	13	26	20	11	26.1
M49	16	10	14	36	15	32	26	14	25	20	14	28.1
M50	19	11	14	37	16	33	22	16	30	15	12	23.1
M51	19	11	13	35	16.2	28.2	22	14	44.2	21	13	23.1
M52	20	10	14	37	7	30	23	14	27	20	13	18
M53	18	11	14	40.3	16	32.2	29	15	28	20	13	28.1
M54	21	13	14	33	18	31.2	19	16	43.2	17	13	24.1
M55	18	12	14	36	18	32.2	22	14	24	19	15	25.1
M56	20	12	15	37	18	31.2	20	14	29	20	12	26.1
M57	16	10	13	37	18	32.2	34	15	43.2	19	13	25.1
M58	19	10	13	37	16	27	21	14	28	16	12	18
M59	19	12	14	35	8	29.2	27	13	26	20	13	19
M60	16	13	15	34	8	28.2	22	16	28	17	13	24.1
M61	16	10	14	38	19	28.2	25	13	25	20	13	26.1
M62	17	10	15	35	17	30.2	22	15	43.2	19	10	25.1
M63	17	11	14	40.3	8	31	23	15	39.2	17	15	27.1
M64	19	11	14	37	16	31.2	25	14	32	19	11	19
M65	20	10	13	34	19	29.2	22	16	27	18	15	26.1
M66	19	12	14	35	19	31.2	19	15	29	20	13	24.1
M67	19	11	16	36	16.2	30.2	18	15	26	19	14	22.1
M68	17	9	15	36	18	26.2	22	16	30	20	12	24.1
M69	16	10	15	36	18	28.2	22	14	28	20	13	28.1
M70	21	10	14	36	17	29	22	15	25	20	14	24.1
M71	15	13	14	38	7	33	25	15	26	18	12	23.1
M72	19	12	14	34	17	29.2	29	15	27	19	12	19
M73	19	12	14	37	17	32.2	20	15	29	19	13	18
M74	20	10	15	37	18	30	23	16	29	22	14	28.1
M75	19	10	15	34	8	32	19	15	30	18	12	24.1
M76	19	9	13	35	8	32	22	14	28	18	14	24.1
M77	18	10	15	34	18	30.2	22	15	30	15	11	18
M78	19	12	13	34	7	32.2	19	13	27	19	12	24.1
M79	20	12	14	35	8	31.2	18	15	28	20	13	25.1
M80	17	12	14	42.3	14	32.2	29	14	28	15	13	18
M81	19	12	13	36	8	30	24	15	32	19	12	23.1
M82	20	11	15	38.3	18	30.2	23	14	44.2	18	11	24.1
M83	19	10	14	36	8	31	21	15	25	19	14	28.1
M84	19	13	13	34	15	28.2	22	14	28	20	12	18
M85	16	10	14	34	8	32	21	15	28	20	15	18

M86	15	10	12	34	16	27.2	18	14	43.2	22	11	27.1
M87	18	13	15	36	17	28	20	15	25	20	14	28.1
M88	18	10	13	35	16.2	29.2	25	14	26	20	12	24.1
M89	20	11	13	42.3	17	29.2	21	15	29	19	14	28.1
M90	18	10	13	36	17	32	20	15	26	20	12	24.1
M91	19	11	12	37	16	28.2	23	16	41.2	20	11	26.1
M92	19	12	14	31	18	31.2	25	16	39.2	20	13	26.1
M93	19	13	13	32	7	29.2	16	15	25	21	12	27.1
M94	19	10	14	38	19	29.2	20	13	28	19	10	28.1
M95	21	13	11	36	16.2	30.2	23	16	30	19	13	30.1
M96	20	12	13	33	18	29	30	16	44.2	21	14	23.1
M97	19	11	15	38	18	32	19	16	27	20	14	25.1
M98	18	11	13	37	18	32.2	27	15	29	22	12	27.1
M99	19	11	13	37	17	30.2	27	15	29	20	13	28.1
M100	19	11	13	37	15	27.2	27	14	44.2	19	12	23.1
M101	18	11	13	36	17	24.2	28	14	28	20	12	24.1
M102	21	10	13	34	18	29.2	22	15	31	19	13	26.1
M103	19	10	13	34	19	28.2	19	16	31	17	8	26.1
M104	18	10	13	35	17	31	21	15	30	21	13	18
M105	19	11	12	35	16	28.2	21	15	26	19	12	25.1
M106	17	10	14	34	8	31.2	21	15	40.2	19	12	28.1
M107	16	12	16	35	18	33	31	14	25	18	13	24.1
M108	17	11	14	34	17	31	24	14	43.2	21	13	26.1
M109	19	10	15	41.3	17	28	22	15	29	21	12	27.1
M110	18	11	15	35	16	34	17	15	45.2	20	13	24.1
M111	18	10	15	35	17	28.2	21	15	29	19	12	25.1
M112	20	10	16	35	15	28.2	22	16	28	17	11	27.1
M113	17	12	14	36	14	31	29	15	25	19	13	28.1
M114	17	13	13	34	17	31	19	15	30	20	15	18
M115	19	12	13	32	17	30.2	17	16	28	17	12	26.1
M116	18	11	15	37	8	30	27	14	27	17	12	25.1
M117	21	12	15	37	16.2	29.2	25	14	29	18	13	25.1
M118	16	10	14	33	15	35	25	13	26	22	13	18
M119	20	10	14	38	16	29.2	25	14	27	19	13	24.1
M120	21	10	14	37	16	31.2	26	14	30	18	12	24.1
M121	18	9	13	34	16	27.2	21	17	42.2	22	12	26.1
M122	19	11	13	34	18	30.2	25	13	27	20	13	25.1
M123	19	10	13	34	8	29.2	22	14	27	18	12	18
M124	18	12	14	36	18	30.2	29	15	25	18	10	25.1
M125	18	12	12	36	16	32.2	17	13	26	17	13	26.1
M126	19	10	15	35	17	28	21	14	27	20	13	28.1
M127	19	10	12	34	17	30.2	28	13	40.2	19	11	29.1
M128	18	12	14	35	16.2	32.2	20	15	29	19	11	24.1
M129	18	12	14	33	16	28.2	24	16	28	20	13	26.1
M130	20	11	14	36	16	28.2	22	15	27	16	15	18
M131	19	11	15	31	17	30.2	28	14	43.2	18	13	25.1

M132	18	11	13	36	7	27.2	24	15	29	18	12	18
M133	16	10	13	35	17	27.2	24	13	44.2	23	12	18
M134	20	10	14	35	17	31.2	19	14	29	19	11	18
M135	19	10	15	36	16	29.2	25	16	39.2	20	12	24.1
M136	19	11	14	35	16	30.2	32	16	27	19	13	23.1
M137	20	11	14	37	17	29.2	26	14	44.2	18	12	25.1
M138	19	10	14	35	13	31.2	23	15	29	20	13	23.1
M139	17	10	13	37	7	31	28	15	29	21	14	30.1
M140	17	12	13	31	14	30	27	16	40.2	19	13	25.1
M141	19	11	14	36	17	30.2	22	14	27	20	13	19
M142	16	10	14	35	15	33	21	14	28	19	14	19
M143	18	12	14	35	16	30	20	14	29	20	13	27.1
M144	17	11	14	38.3	19	32	27	14	46.2	19	14	25.1
M145	19	10	15	36	15	29.2	24	15	25	20	13	26.1
M146	17	12	16	35	18	30.2	19	14	43.2	19	13	18
M147	20	11	15	35	15	30.2	30	13	30	19	14	25.1
M148	19	11	13	33	15	29.2	25	16	27	20	14	28.1
M149	17	11	14	33	8	30.2	26	13	29	18	10	24.1
M150	19	12	13	32	20	27.2	22	15	29	20	11	24.1
M151	19	11	12	35	8	27.2	21	13	28	20	12	24.1
M152	17	10	12	40.3	16	33	28	16	28	19	13	18
M153	19	11	12	34	17	30.2	25	14	44.2	22	12	24.1
M154	19	10	14	35	16	27.2	22	16	28	22	12	27.1
M155	16	10	15	34	8	34	20	13	27	20	13	22.1
M156	20	12	16	38.3	8	29.2	23	15	30	20	13	18
M157	16	11	14	34	8	31	26	14	29	20	13	28.1
M158	18	11	14	34	17	33	23	15	29	19	13	25.1
M159	19	10	13	37	8	31.2	21	13	25	19	12	22.1
M160	21	11	12	37	19	30.2	24	15	28	20	10	26.1
M161	20	11	12	33	17	28.2	29	14	31	18	13	25.1
M162	19	10	13	35	18	29.2	29	15	29	18	14	26.1
M163	20	10	15	33	7	31.2	22	15	27	19	13	30.1
M164	17	11	13	36	19	26.2	17	16	40.2	17	12	23.1
M165	20	10	13	38.3	8	32.2	22	14	42.2	19	14	23.1
M166	18	12	11	34	17	33	18	13	27	19	12	18
M167	19	10	14	37	16	32	19	16	28	22	13	26.1
M168	15	10	14	35	17	31	25	15	26	19	14	27.1
M169	19	11	13	36	7	31.2	24	13	25	20	14	26.1
M170	17	10	15	35	16.2	28	17	14	29	19	12	27.1
M171	19	12	14	35	8	30.2	26	14	30	18	13	24.1
M172	20	10	16	36	17	29.2	19	16	40.2	20	14	24.1
M173	17	11	15	35	16	30.2	25	14	25	17	13	28.1
M174	15	12	15	38.3	7	33.2	18	14	28	20	13	25.1
M175	18	13	14	35	17	24	29	14	28	20	12	20
Z176	19,19	10,10	14,15	38,42.3	17,17	29.2,31.2	22,26	13,15	24,31	19,20	12,13	25.1,27.1
Z177	19,19	10,11	14,15	33,35	17,17	29.2,29.2	23,34	15,16	37,39.2	17,17	11,11	23.1,25.1

Z178	18,20	11,11	13,15	32,39.3	8,18	30,31.2	25,25	13,14	28,40.2	18,20	12,12	13.3,25.1
Z179	16,19	11,12	14,14	37.2,38.2	8,16.2	28.2,32	23,29	15,15	26,28	15,17	12,17	25.1,26.1
Z180	16,18	10,10	14,14	33,35	8,19	29,30.2	21,25	14,16	28,29	19,19	9,11	20,23.1
Z181	19,20	11,13	14,14	33,36	8,16	28.2,30.2	24,25	14,16	25,43.2	19,20	11,14	18,27.1
Z182	19,20	11,12	15,15	31,35	16,18	30.2,30.2	20,22	15,15	26,31	18,20	11,12	27.1,27.1
Z183	17,19	11,11	12,13	34,36	8,15	30.2,31	27,28	15,16	26,31	18,20	12,15	24.1,25.1
Z184	18,19	11,12	14,15	37,40.3	16,19	29.2,30.2	19,27	14,15	40.2,41.2	15,19	11,11	23.1,24.1
Z185	17,19	11,12	13,15	35,35	7,7	31.2,32	28,31	15,16	27,27	17,18	12,14	18,24.1
Z186	16,18	10,10	14,14	35,36	17,20	28.2,32	20,20	15,15	29,30	19,21	12,14	18,18
Z187	18,19	9,10	13,14	34,35	16,17	30.2,32	22,23	13,14	25,26	19,21	12,15	24.1,25.1
Z188	16,19	12,12	13,14	35,35	8,17	28.2,31	20,25	15,16	26,46.2	18,18	12,13	22.1,26.1
Z189	20,21	10,12	14,15	35,37	17,17	29.2,30.2	22,28	15,15	29,31	15,20	14,14	18,18
Z190	19,19	9,11	13,14	33,34	15,16	29.2,30.2	23,31	15,16	27,44.2	15,21	11,11	18,24.1
Z191	16,19	12,12	14,14	34,36	8,16	30.2,30.2	20,28	14,16	28,30	18,21	11,14	24.1,25.1
Z192	19,20	12,12	13,15	34,37	17,19	32,34	22,27	14,16	25,28	19,21	12,13	24.1,25.1
Z193	17,18	9,11	13,15	35,38	7,8	26.2,31	19,21	15,15	27,30	17,18	11,13	26.1,27.1
Z194	18,19	10,11	13,15	36,40.3	17,18	28.2,28.2	20,23	14,14	27,28	19,20	11,12	24.1,24.1
Z195	19,19	10,11	14,15	31,38	15,16	30,31	25,27	14,15	25,29	17,19	13,14	23.1,25.1
Z196	16,18	11,11	13,15	34,35	10,16	29.2,30	26,27	15,16	30,31	19,20	12,13	25.1,26.1
Z197	17,19	11,11	13,13	36,38	7,17	29.2,31	22,25	14,15	39.2,40.2	17,21	12,13	23.1,26.1
Z198	18,19	11,12	14,15	36,37	16,17	28,35	24,26	15,15	25,47.2	19,20	12,12	24.1,25.1
Z199	19,20	10,11	15,15	35,37	8,19	30.2,30.2	22,26	15,16	26,40.2	19,20	12,13	18,18
Z200	19,19	10,11	14,15	34,37	15,17	28.2,30.2	19,31	14,15	25,42.2	17,20	12,14	24.1,24.1

6.2. FREKVENCije HAPLOTIPOVA

Tabela 8. Struktura i učestalost haplotipova I grupe

DXS10148	DXS10135	DXS8378	BROJ	FREKVENCIJA
18	18	12	1	0,0057
18	19	10	2	0,0114
18	19	11	1	0,0057
18	19	12	2	0,0114
18	19	13	1	0,0057
18	20	12	1	0,0057
18	21	10	3	0,0171
18	21	12	1	0,0057
18	22	10	2	0,0114
18	22	11	1	0,0057
18	22	13	1	0,0057
18	23	10	1	0,0057
18	23	12	1	0,0057
18	24	10	1	0,0057
18	24	11	1	0,0057
18	25	10	1	0,0057
18	28	10	1	0,0057
18	28	11	1	0,0057
18	29	12	1	0,0057
19	21	10	1	0,0057
19	22	11	1	0,0057
19	23	12	1	0,0057
19	25	11	1	0,0057
19	27	12	1	0,0057
19	27	13	1	0,0057
19	29	12	1	0,0057
20	17	10	1	0,0057
20	29	13	1	0,0057
22.1	17	11	1	0,0057
22.1	18	11	1	0,0057
22.1	20	10	1	0,0057
22.1	21	10	1	0,0057
23	18	11	1	0,0057
23.1	17	11	1	0,0057
23.1	20	11	1	0,0057
23.1	22	10	1	0,0057
23.1	22	11	2	0,0114
23.1	23	9	1	0,0057
23.1	23	10	1	0,0057
23.1	24	12	1	0,0057
23.1	25	13	1	0,0057
23.1	26	10	1	0,0057
23.1	27	11	1	0,0057
23.1	30	11	1	0,0057
23.1	30	12	1	0,0057

23.1	32	11	1	0,0057
24.1	16	12	1	0,0057
24.1	17	11	1	0,0057
24.1	19	10	2	0,0114
24.1	19	12	2	0,0114
24.1	19	13	1	0,0057
24.1	20	10	1	0,0057
24.1	20	11	2	0,0114
24.1	20	12	1	0,0057
24.1	21	10	1	0,0057
24.1	21	11	1	0,0057
24.1	22	9	3	0,0171
24.1	22	10	2	0,0114
24.1	22	11	1	0,0057
24.1	22	12	1	0,0057
24.1	22	13	1	0,0057
24.1	23	11	1	0,0057
24.1	25	10	3	0,0171
24.1	25	11	1	0,0057
24.1	26	10	2	0,0114
24.1	26	11	1	0,0057
24.1	26	12	1	0,0057
24.1	28	11	1	0,0057
24.1	31	12	1	0,0057
25.1	18	12	2	0,0114
25.1	19	11	1	0,0057
25.1	20	10	1	0,0057
25.1	20	11	1	0,0057
25.1	20	12	1	0,0057
25.1	21	10	1	0,0057
25.1	21	11	1	0,0057
25.1	22	10	1	0,0057
25.1	22	11	1	0,0057
25.1	22	12	1	0,0057
25.1	23	10	1	0,0057
25.1	23	11	1	0,0057
25.1	24	10	2	0,0114
25.1	25	11	2	0,0114
25.1	25	12	1	0,0057
25.1	26	11	1	0,0057
25.1	27	11	2	0,0114
25.1	27	12	1	0,0057
25.1	28	10	1	0,0057
25.1	28	11	1	0,0057
25.1	29	11	1	0,0057
25.1	29	12	1	0,0057
25.1	30	11	1	0,0057
25.1	34	10	1	0,0057
26.1	17	12	2	0,0114
26.1	19	10	2	0,0114
26.1	20	10	1	0,0057
26.1	20	12	1	0,0057

26.1	21	9	1	0,0057
26.1	21	10	2	0,0114
26.1	21	12	1	0,0057
26.1	22	10	3	0,0171
26.1	23	11	1	0,0057
26.1	24	10	2	0,0114
26.1	24	11	4	0,0229
26.1	24	12	1	0,0057
26.1	25	10	1	0,0057
26.1	25	12	1	0,0057
26.1	26	10	1	0,0057
26.1	29	10	1	0,0057
26.1	31	11	1	0,0057
27.1	16	13	1	0,0057
27.1	17	10	1	0,0057
27.1	18	10	1	0,0057
27.1	20	12	1	0,0057
27.1	21	11	1	0,0057
27.1	22	10	3	0,0171
27.1	23	11	2	0,0114
27.1	25	10	1	0,0057
27.1	27	11	1	0,0057
28.1	19	11	1	0,0057
28.1	20	10	2	0,0114
28.1	20	13	1	0,0057
28.1	21	10	3	0,0171
28.1	21	11	1	0,0057
28.1	21.1	10	1	0,0057
28.1	22	10	1	0,0057
28.1	23	10	1	0,0057
28.1	25	11	2	0,0114
28.1	26	10	1	0,0057
28.1	26	11	1	0,0057
28.1	27	11	1	0,0057
28.1	29	11	1	0,0057
28.1	29	12	1	0,0057
29.1	22	10	1	0,0057
29.1	28	10	1	0,0057
29.1	28	11	1	0,0057
30.1	22	10	1	0,0057
30.1	23	13	1	0,0057
30.1	25	11	1	0,0057
30.1	28	10	1	0,0057

Tabela 9. Struktura i učestalost haplotipova II grupe

DXS7132	DXS10079	DXS10074	BROJ	FREKVENCIJA
11	19	16.2	1	0,0057
11	19	17	1	0,0057
12	17	16	1	0,0057
12	18	17	1	0,0057
12	19	16	2	0,0114
12	19	17	1	0,0057
12	20	8	1	0,0057
12	20	16	1	0,0057
12	20	17	1	0,0057
12	20	19	1	0,0057
12	22	16	1	0,0057
12	22	17	1	0,0057
13	16	16	1	0,0057
13	17	8	1	0,0057
13	17	17	1	0,0057
13	17	19	2	0,0114
13	18	7	1	0,0057
13	18	8	2	0,0114
13	18	18	1	0,0057
13	18	19	1	0,0057
13	18	20	1	0,0057
13	19	7	1	0,0057
13	19	8	3	0,0171
13	19	14	1	0,0057
13	19	15	1	0,0057
13	19	17	2	0,0114
13	19	18	2	0,0114
13	19	20	1	0,0057
13	20	7	1	0,0057
13	20	15	2	0,0114
13	20	16	1	0,0057
13	20	16.2	1	0,0057
13	20	17	5	0,0286
13	20	18	2	0,0114
13	20	20	1	0,0057
13	21	7	2	0,0114
13	21	16	1	0,0057
13	21	16.2	1	0,0057
13	21	17	3	0,0171
13	21	18	2	0,0114
13	21	19	1	0,0057
13	22	16	1	0,0057
13	22	18	1	0,0057
13	23	17	1	0,0057
14	13	16	1	0,0057
14	15	14	1	0,0057
14	15	16	1	0,0057

14	15	19	1	0,0057
14	16	8	1	0,0057
14	16	16	1	0,0057
14	17	8	2	0,0114
14	17	18	2	0,0114
14	18	7	1	0,0057
14	18	8	2	0,0114
14	18	16	1	0,0057
14	18	17	1	0,0057
14	18	18	1	0,0057
14	19	7	2	0,0114
14	19	8	2	0,0114
14	19	14	1	0,0057
14	19	15	2	0,0114
14	19	16	3	0,0171
14	19	16.2	2	0,0114
14	19	17	5	0,0286
14	19	18	2	0,0114
14	19	19	2	0,0114
14	20	7	1	0,0057
14	20	8	7	0,0400
14	20	13	1	0,0057
14	20	15	1	0,0057
14	20	16	3	0,0171
14	20	17	4	0,0229
14	20	18	3	0,0171
14	20	19	2	0,0114
14	21	8	1	0,0057
14	21	17	1	0,0057
14	21	18	1	0,0057
14	22	8	1	0,0057
14	22	15	1	0,0057
14	22	16	2	0,0114
15	15	18	1	0,0057
15	17	8	4	0,0229
15	17	16	2	0,0114
15	18	8	2	0,0114
15	18	16.2	1	0,0057
15	18	17	1	0,0057
15	18	18	2	0,0114
15	19	7	1	0,0057
15	19	9	1	0,0057
15	19	15	2	0,0114
15	19	16	1	0,0057
15	19	16.2	1	0,0057
15	19	17	2	0,0114
15	20	7	1	0,0057
15	20	8	1	0,0057
15	20	15	1	0,0057
15	20	16	2	0,0114
15	20	17	3	0,0171
15	20	18	5	0,0286

15	21	7	1	0,0057
15	21	17	1	0,0057
15	22	16	1	0,0057
15	22	18	1	0,0057
16	17	15	2	0,0114
16	17	16	1	0,0057
16	18	18	1	0,0057
16	19	16.2	1	0,0057
16	19	18	1	0,0057
16	20	8	1	0,0057
16	20	17	1	0,0057
17	19	15	1	0,0057
17	20	18	1	0,0057

Tabela 10. Struktura i učestalost haplotipova III grupe

DXS10103	HPRTB	DXS10101	BROJ	FREKVENCIJA
14	12	31.2	1	0,0057
15	11	27.2	1	0,0057
15	12	33	1	0,0057
15	13	33.2	1	0,0057
15	14	31	1	0,0057
16	12	27.2	1	0,0057
16	12	30.2	1	0,0057
16	12	31	1	0,0057
16	13	28.2	4	0,0229
16	13	31	1	0,0057
16	13	32.2	1	0,0057
16	13	33	1	0,0057
16	13	34	1	0,0057
16	13	35	1	0,0057
16	14	32	1	0,0057
16	14	33	1	0,0057
16	15	32	1	0,0057
17	10	30.2	2	0,0114
17	10	31.2	1	0,0057
17	12	26.2	2	0,0114
17	12	28	1	0,0057
17	12	31.2	1	0,0057
17	12	32	1	0,0057
17	13	30	1	0,0057
17	13	30.2	2	0,0114
17	13	31	2	0,0114
17	13	32.2	1	0,0057
17	13	33	1	0,0057
17	14	31	1	0,0057
17	14	32	1	0,0057
17	15	31	2	0,0114
18	9	29.2	1	0,0057
18	9	30.2	1	0,0057
18	10	30.2	1	0,0057
18	11	30.2	2	0,0114
18	11	32.2	1	0,0057
18	12	24	1	0,0057
18	12	24.2	1	0,0057
18	12	27.2	3	0,0171
18	12	28.2	2	0,0114
18	12	29.2	2	0,0114
18	12	30	1	0,0057
18	12	32	3	0,0171
18	12	32.2	1	0,0057
18	12	33	1	0,0057
18	13	28.2	1	0,0057
18	13	29.2	1	0,0057

18	13	30	2	0,0114
18	13	31	2	0,0114
18	13	31.2	1	0,0057
18	13	32.2	3	0,0171
18	13	33	1	0,0057
18	13	34	1	0,0057
18	14	28	1	0,0057
18	14	31.2	1	0,0057
18	15	32.2	1	0,0057
19	8	28.2	2	0,0114
19	10	29.2	1	0,0057
19	11	27.2	1	0,0057
19	11	28.2	1	0,0057
19	11	30.2	1	0,0057
19	11	31.2	2	0,0114
19	12	27	1	0,0057
19	12	27.2	5	0,0286
19	12	28	1	0,0057
19	12	28.2	3	0,0171
19	12	29.2	4	0,0229
19	12	30	1	0,0057
19	12	30.2	3	0,0171
19	12	31.2	2	0,0114
19	12	32	2	0,0114
19	12	32.2	1	0,0057
19	12	33	1	0,0057
19	13	27.2	1	0,0057
19	13	28	1	0,0057
19	13	28.2	3	0,0171
19	13	29.2	2	0,0114
19	13	30.2	6	0,0343
19	13	31	1	0,0057
19	13	31.2	3	0,0171
19	13	32	1	0,0057
19	13	32.2	3	0,0171
19	13	33	2	0,0114
19	14	29.2	2	0,0114
19	14	30	1	0,0057
19	14	30.2	1	0,0057
19	14	31	1	0,0057
19	14	31.2	2	0,0114
19	14	32	2	0,0114
19	15	30.2	1	0,0057
19	15	31	1	0,0057
19	15	32	1	0,0057
20	10	30.2	1	0,0057
20	11	28.2	2	0,0114
20	11	30.2	1	0,0057
20	11	31.2	1	0,0057
20	12	29.2	1	0,0057
20	12	31.2	1	0,0057
20	13	28.2	1	0,0057

20	13	29.2	2	0,0114
20	13	30	1	0,0057
20	13	30.2	1	0,0057
20	13	31.2	3	0,0171
20	14	29	1	0,0057
20	14	29.2	2	0,0114
20	14	30	1	0,0057
20	14	30.2	2	0,0114
20	14	32.2	1	0,0057
20	15	28.2	1	0,0057
20	15	29.2	1	0,0057
20	15	31.2	1	0,0057
21	10	30.2	1	0,0057
21	12	31.2	1	0,0057
21	13	29.2	2	0,0114
21	13	30.2	1	0,0057
21	13	31.2	1	0,0057
21	13	32	1	0,0057
21	14	29	1	0,0057

Tabela 11. Struktura i učestalost haplotipova IV grupe

DXS10146	DXS10134	DXS7423	BROJ	FREKVENCIJA
24	36	14	1	0,0057
24	43.3	15	1	0,0057
25	32	15	1	0,0057
25	35	14	2	0,0114
25	36	13	1	0,0057
25	36	14	1	0,0057
25	36	15	6	0,0343
25	37	13	1	0,0057
25	38	13	1	0,0057
26	33	13	1	0,0057
26	34	13	1	0,0057
26	35	13	1	0,0057
26	35	14	1	0,0057
26	35	15	5	0,0286
26	36	13	1	0,0057
26	36	14	1	0,0057
26	36	15	5	0,0286
26	38	13	1	0,0057
26	38	15	1	0,0057
27	33	15	1	0,0057
27	33	16	1	0,0057
27	34	13	4	0,0229
27	34	14	1	0,0057
27	34	15	1	0,0057
27	34	16	1	0,0057
27	35	14	1	0,0057
27	35	15	1	0,0057
27	35	16	1	0,0057
27	36	14	3	0,0171
27	36	15	1	0,0057
27	37	14	2	0,0114
27	38	14	1	0,0057
27	38	16	1	0,0057
27	38.3	15	1	0,0057
28	32	16	1	0,0057
28	33	13	1	0,0057
28	33	16	1	0,0057
28	34	14	1	0,0057
28	34	15	1	0,0057
28	34	16	1	0,0057
28	35	13	1	0,0057
28	35	14	5	0,0286
28	35	15	2	0,0114
28	35	16	3	0,0171
28	36	14	4	0,0229
28	37	14	1	0,0057
28	37	15	3	0,0171

28	37	16	1	0,0057
28	38	13	1	0,0057
28	38.3	14	1	0,0057
28	40.3	15	1	0,0057
28	40.3	16	1	0,0057
28	42.3	14	2	0,0114
29	32	15	1	0,0057
29	33	13	1	0,0057
29	34	14	1	0,0057
29	34	15	1	0,0057
29	35	14	5	0,0286
29	35	15	5	0,0286
29	35	16	1	0,0057
29	36	15	1	0,0057
29	37	14	2	0,0114
29	37	15	4	0,0229
29	37	16	1	0,0057
29	37	17	1	0,0057
29	40.3	14	1	0,0057
29	41.3	15	1	0,0057
29	42.3	15	1	0,0057
30	34	15	3	0,0171
30	34	16	1	0,0057
30	35	13	1	0,0057
30	35	14	1	0,0057
30	35	15	1	0,0057
30	35	17	1	0,0057
30	36	16	2	0,0114
30	37	14	1	0,0057
30	37	16	1	0,0057
30	38.3	15	1	0,0057
30	38.3	16	1	0,0057
30	40.3	14	1	0,0057
31	33	14	1	0,0057
31	34	15	1	0,0057
31	34	16	1	0,0057
31	36	14	1	0,0057
32	36	15	1	0,0057
32	37	14	1	0,0057
33.2	34	17	1	0,0057
39.2	31	16	1	0,0057
39.2	36	15	1	0,0057
39.2	36	16	1	0,0057
39.2	37	15	1	0,0057
39.2	39.3	14	1	0,0057
39.2	40.3	14	1	0,0057
39.2	40.3	15	1	0,0057
40.2	31	16	1	0,0057
40.2	34	13	1	0,0057
40.2	34	15	1	0,0057
40.2	36	15	1	0,0057
40.2	36	16	2	0,0114

41.2	36	14	1	0,0057
41.2	37	16	1	0,0057
42.2	34	17	1	0,0057
42.2	37	14	1	0,0057
42.2	38	13	1	0,0057
42.2	38.3	14	1	0,0057
42.2	40.3	15	1	0,0057
43.2	31	14	1	0,0057
43.2	33	16	1	0,0057
43.2	34	14	2	0,0114
43.2	35	14	1	0,0057
43.2	35	15	1	0,0057
43.2	37	15	1	0,0057
44.2	33	16	1	0,0057
44.2	34	14	1	0,0057
44.2	34	16	1	0,0057
44.2	35	13	1	0,0057
44.2	35	14	1	0,0057
44.2	37	14	2	0,0114
44.2	38.3	14	1	0,0057
45.2	33	15	1	0,0057
45.2	35	15	1	0,0057
45.2	40.3	14	1	0,0057
46.2	37	15	1	0,0057
46.2	38.3	14	1	0,0057

Tabela 12. Distribucija haplotipova za sve 4 grupe

Grupa	Broj mogućih haplotipova	Broj različitih haplotipova	Broj jedinstvenih haplotipova	Frekvencija najčešćeg haplotipa
I	1330	140	113	0,0229
II	910	112	73	0,0400
III	1368	118	81	0,0343
IV	1300	124	102	0,0343

U ispitivanom uzorku od 175 muških osoba populacije Vojvodine, pronađeno je 140 haplotipova u prvoj grupi, 112 haplotipova u drugoj grupi, 118 haplotipova u trećoj grupi i 124 haplotipa u četvrtoj grupi, što ukupno predstavlja 494 različita haplotipa (Tabela 12). Najučestaliji haplotip je 14-20-8, pripada kombinaciji lokusa iz druge grupe (DXS7132-DXS10079-DXS10074) i pronađen je 7 puta u ispitivanom uzorku populacije, odnosno ima učestalost od 4%. U samo jednoj kopiji, nađeno je ukupno 369 haplotipova.

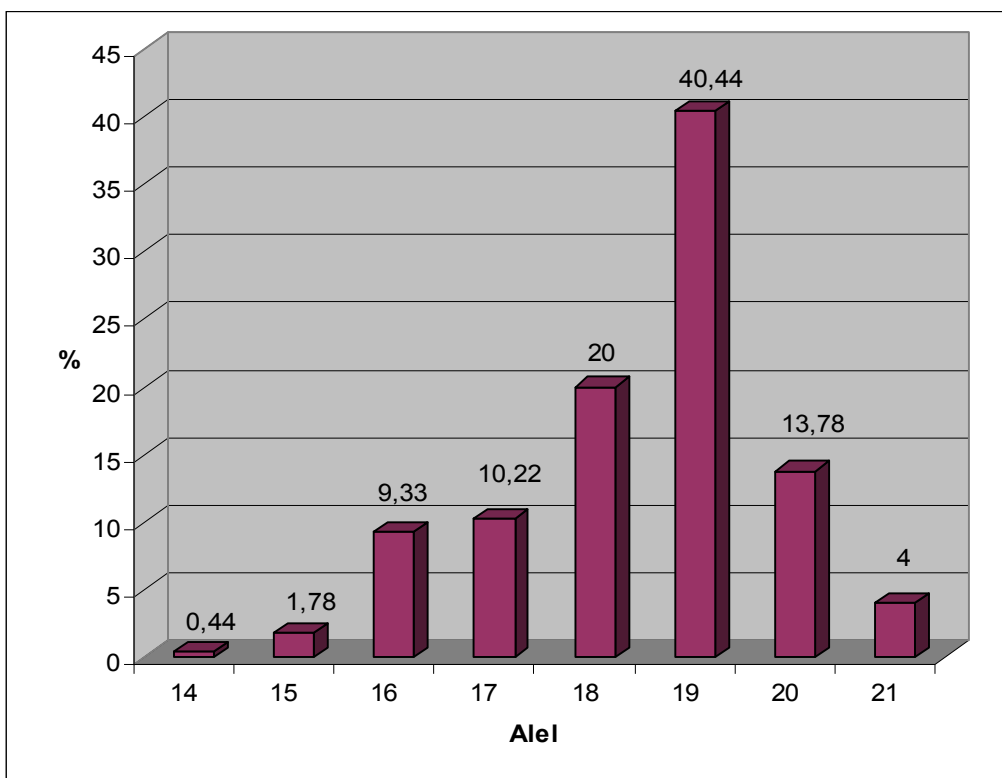
6.3. FREKVENCije ALELA I STATISTIČKI PARAMETRI

Distribucija i frekvencija alela analizirana je i predstavljena za svaki lokus pojedinačno.

LOKUS DXS10103

Tabela 13. Frekvencija alela u lokusu DXS10103

ALEL	BROJ ALELA	FREKVENCIJA	%
14	1	0,0044	0,44
15	4	0,0178	1,78
16	21	0,0933	9,33
17	23	0,1022	10,22
18	45	0,2000	20
19	91	0,4044	40,44
20	31	0,1378	13,78
21	9	0,0400	4



Grafikon 1. Frekvencija alela u lokusu DXS10103

Tabela 14. Opšti i forenzički statistički parametri u lokusu DXS10103

General	
Polymorphism information content (PIC):	0.725931
Homozygotie (h):	0.243614
Heterozygotie (HET):	0.756386
Power of Exclusion (PE):	0.520755
Paternity Index (PI):	0.121807
Power of Discrimination	
PD female:	0.910198
PD male:	0.756386
Mean paternity exclusion chance	
MEC Krüger:	0.554359
MEC Kishida:	0.725815
MEC Desmarais:	0.725931
MEC Desmarais Duo:	0.591473

Analiziranjem lokusa DXS10103, pronađeno je ukupno 8 alela. Najučestaliji alel je 19, koji je prisutan kod 40,44% populacije Vojvodine, a najređi alel 14, sa učestalošću od 0,44% (Tabela 13, Grafikon 1).

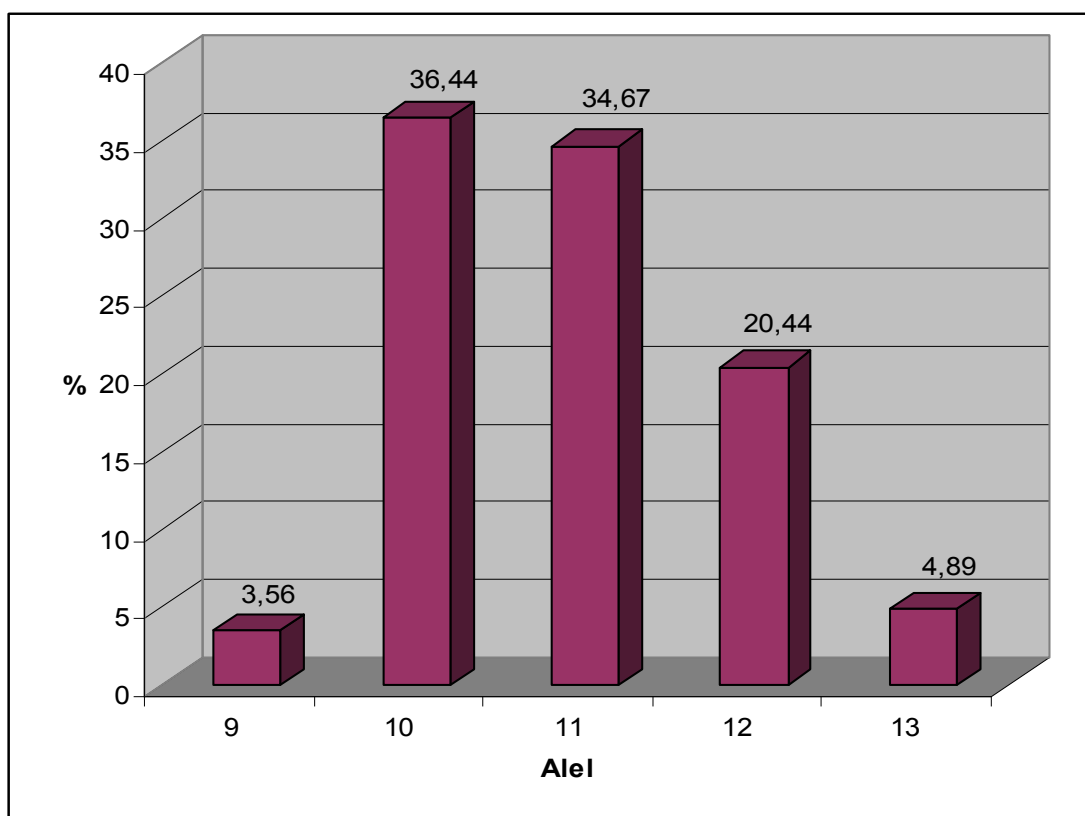
Polimorfnost lokusa iznosi 0,73, heterozigotnost 75,64%, moć isključivanja 52,08%, indeks očinstva 0,12, moć diskriminacije za ženske osobe 91,02%, a za muške osobe 75,64% (Tabela 14).

Prosečna šansa isključivanja, prema formuli Krugera, iznosi 55,43%, prema formuli Kišide 72,58%, a prema formulama Desmaraisa 72,59%, odnosno 59,15 (Tabela 14).

LOKUS DXS8378

Tabela 15. Frekvencija alela u lokusu DXS8378

ALEL	BROJ ALELA	FREKVENCIJA	%
9	8	0,0356	3,56
10	82	0,3644	36,44
11	78	0,3467	34,67
12	46	0,2044	20,44
13	11	0,0489	4,89



Grafikon 2. Frekvencija alela u lokusu DXS8378

Tabela 16. Opšti i forenzički statistički parametri lokusu DXS8378

General	
Polymorphism information content (PIC):	0.646349
Homozygotie (h):	0.298426
Heterozygotie (HET):	0.701574
Power of Exclusion (PE):	0.430699
Paternity Index (PI):	0.149213
Power of Discrimination	
PD female:	0.855717
PD male:	0.701574
Mean paternity exclusion chance	
MEC Krüger:	0.444507
MEC Kishida:	0.646349
MEC Desmarais:	0.646349
MEC Desmarais Duo:	0.501911

Analiziranjem lokusa DXS8378, pronađeno je ukupno 5 alela. Najučestaliji alel je 10, koji je prisutan kod 36,44% populacije Vojvodine, a najređi alel 9, sa učestalošću od 3,56% (Tabela 15, Grafikon 2).

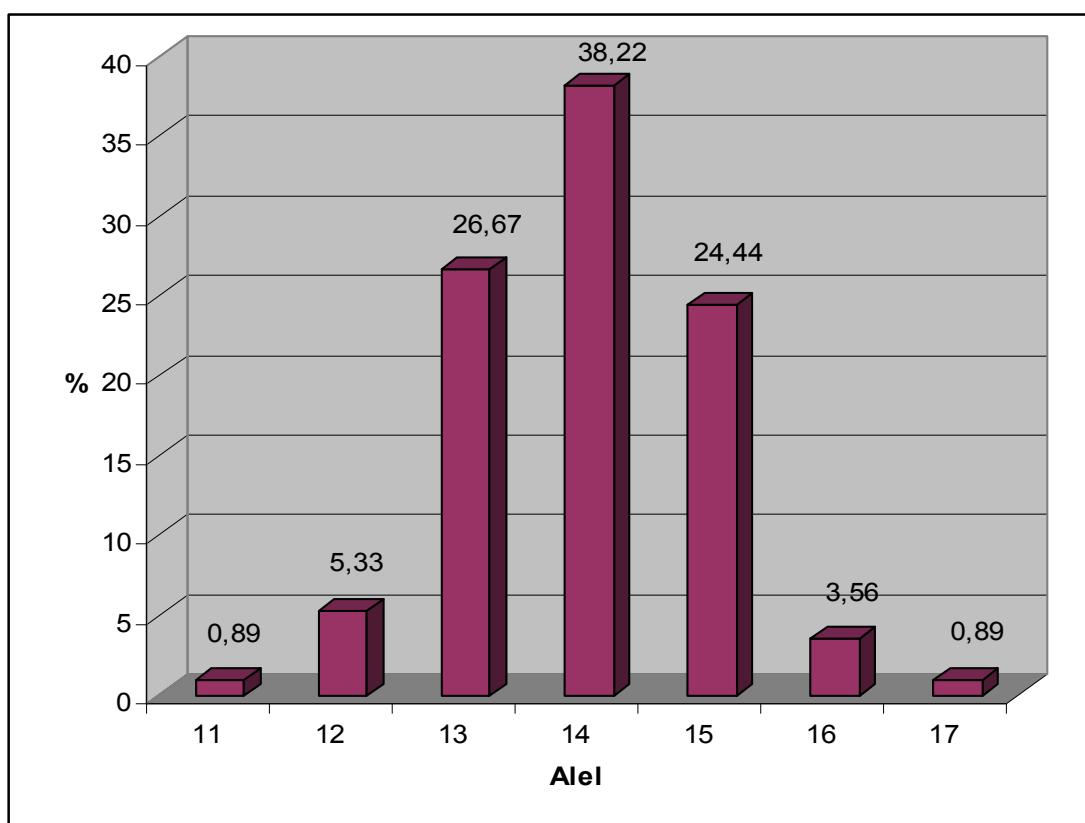
Polimorfnost lokusa iznosi 0,65, heterozigotnost 70,16%, moć isključivanja 43,07%, indeks očinstva 0,15, moć diskriminacije za ženske osobe 85,57%, a za muške osobe 70,16% (Tabela 16).

Prosečna šansa isključivanja, prema formuli Krugera, iznosi 44,45%, prema formuli Kišide 64,64%, a prema formulama Desmaraisa 64,64%, odnosno 50,19% (Tabela 16).

LOKUS DXS7132

Tabela 17. Frekvencija alela u lokusu DXS7132

ALEL	BROJ ALELA	FREKVENCIJA	%
11	2	0,0089	0,89
12	12	0,0533	5,33
13	60	0,2667	26,67
14	86	0,3822	38,22
15	55	0,2444	24,44
16	8	0,0356	3,56
17	2	0,0089	0,89



Grafikon 3. Frekvencija alela u lokusu DXS7132

Tabela 18. Opšti i forenzički statistički parametri u lokusu DXS7132

General	
Polymorphism information content (PIC):	0.669696
Homozygotie (h):	0.281204
Heterozygotie (HET):	0.718796
Power of Exclusion (PE):	0.457934
Paternity Index (PI):	0.140602
Power of Discrimination	
PD female:	0.871824
PD male:	0.718796
Mean paternity exclusion chance	
MEC Krüger:	0.473442
MEC Kishida:	0.669696
MEC Desmarais:	0.669696
MEC Desmarais Duo:	0.527189

Analiziranjem lokusa DXS7132, pronađeno je ukupno 7 alela. Najučestaliji je alel 14, koji je prisutan kod 38,22% populacije Vojvodine, a najređi aleli 11 i 17, sa učestalošću od 0,89% (Tabela 17, Grafikon 3).

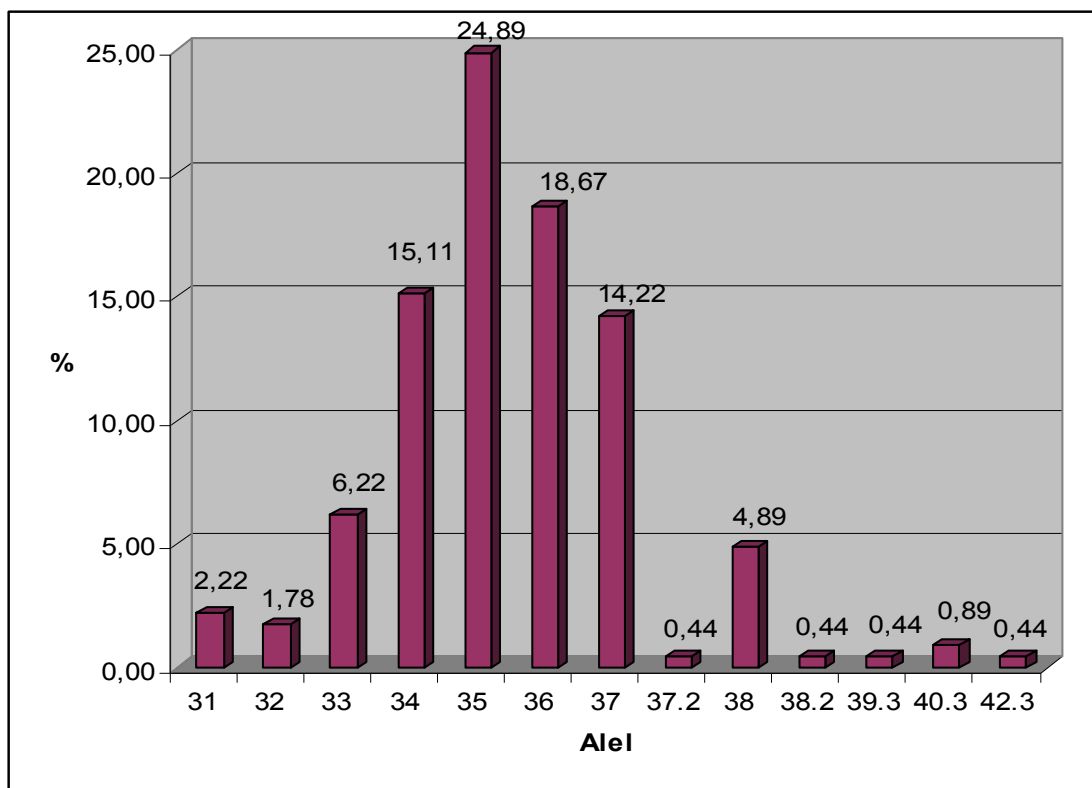
Polimorfnost lokusa iznosi 0,67, heterozigotnost 71,88%, moć isključivanja 45,79%, indeks očinstva 0,14, moć diskriminacije za ženske osobe 87,18%, a za muške osobe 71,88% (Tabela 18).

Prosečna šansa isključivanja, prema formuli Krugera, iznosi 47,34%, prema formuli Kišide 66,97%, a prema formulama Desmaraisa 66,97%, odnosno 52,72%. (Tabela 18).

LOKUS DXS10134

Tabela 19. Frekvencija alela u lokusu DXS10134

ALEL	BROJ ALELA	FREKVENCIJA	%
31	5	0,0222	2,22
32	4	0,0178	1,78
33	14	0,0622	6,22
34	34	0,1511	15,11
35	56	0,2489	24,89
36	42	0,1867	18,67
37	32	0,1422	14,22
37.2	1	0,0044	0,44
38	11	0,0489	4,89
38.2	1	0,0044	0,44
39.3	1	0,0044	0,44
40.3	2	0,0089	0,89
42.3	1	0,0044	0,44



Grafikon 4. Frekvencija alela u lokusu DXS10134

Tabela 20. Opšti i forenzički statistički parametri u lokusu DXS10134

General	
Polymorphism information content (PIC):	0.837283
Homozygotie (h):	0.147087
Heterozygotie (HET):	0.852913
Power of Exclusion (PE):	0.700615
Paternity Index (PI):	0.073543
Power of Discrimination	
PD female:	0.962735
PD male:	0.852913
Mean paternity exclusion chance	
MEC Krüger:	0.609405
MEC Kishida:	0.732707
MEC Desmarais:	0.837283
MEC Desmarais Duo:	0.734455

Analiziranjem lokusa DXS10134, pronađeno je ukupno 13 alela. Najučestaliji je alel 35, koji je prisutan kod 24,89% populacije Vojvodine, a najređi aleli 37.2, 38.2, 39.3 i 42.3 sa učestalošću od 0,44% (Tabela 19, Grafikon 4).

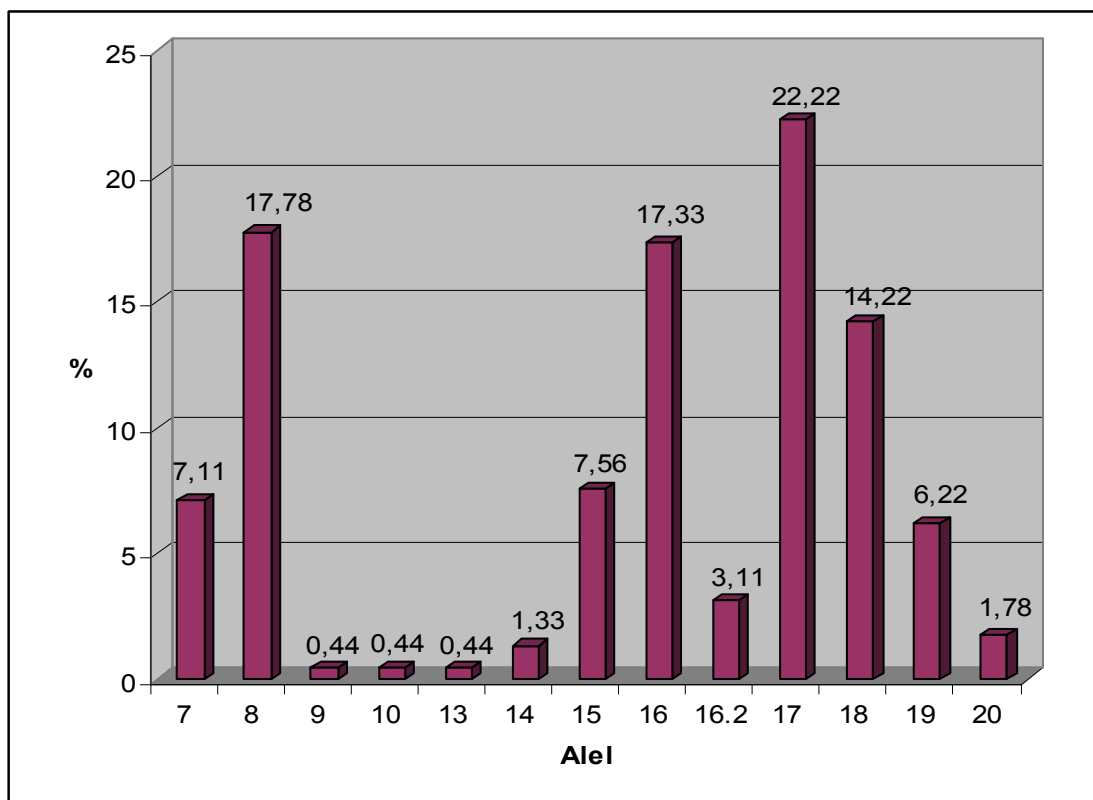
Polimorfnost lokusa iznosi 0,84, heterozigotnost 85,29%, moć isključivanja 70,06%, indeks očinstva 0,07, moć diskriminacije za ženske osobe 96,27%, a za muške osobe 85,29% (Tabela 20).

Prosečna šansa isključivanja, prema formuli Krugera, iznosi 60,94%, prema formuli Kišide 73,27%, a prema formulama Desmaraisa 83,73%, odnosno 73,45% (Tabela 20).

LOKUS DXS10074

Tabela 21. Frekvencija alela u lokusu DXS10074

ALEL	BROJ ALELA	FREKVENCIJA	%
7	16	0,0711	7,11
8	40	0,1778	17,78
9	1	0,0044	0,44
10	1	0,0044	0,44
13	1	0,0044	0,44
14	3	0,0133	1,33
15	17	0,0756	7,56
16	39	0,1733	17,33
16.2	7	0,0311	3,11
17	50	0,2222	22,22
18	32	0,1422	14,22
19	14	0,0622	6,22
20	4	0,0178	1,78



Grafikon 5. Frekvencija alela u lokusu DXS10074

Tabela 22. Opšti i forenzički statistički parametri u lokusu DXS10074

General	
Polymorphism information content (PIC):	0.835698
Homozygotie (h):	0.147398
Heterozygotie (HET):	0.852602
Power of Exclusion (PE):	0.700000
Paternity Index (PI):	0.073699
Power of Discrimination	
PD female:	0.961370
PD male:	0.852602
Mean paternity exclusion chance	
MEC Krüger:	0.705484
MEC Kishida:	0.835474
MEC Desmarais:	0.835698
MEC Desmarais Duo:	0.730946

Analiziranjem lokusa DXS10074, pronađeno je ukupno 13 alela. Najučestaliji je alel 17, koji je prisutan kod 22,22% populacije Vojvodine, a najređi aleli 9, 10, i 13 sa učestalošću od 0,44% (Tabela 21, Grafikon 5).

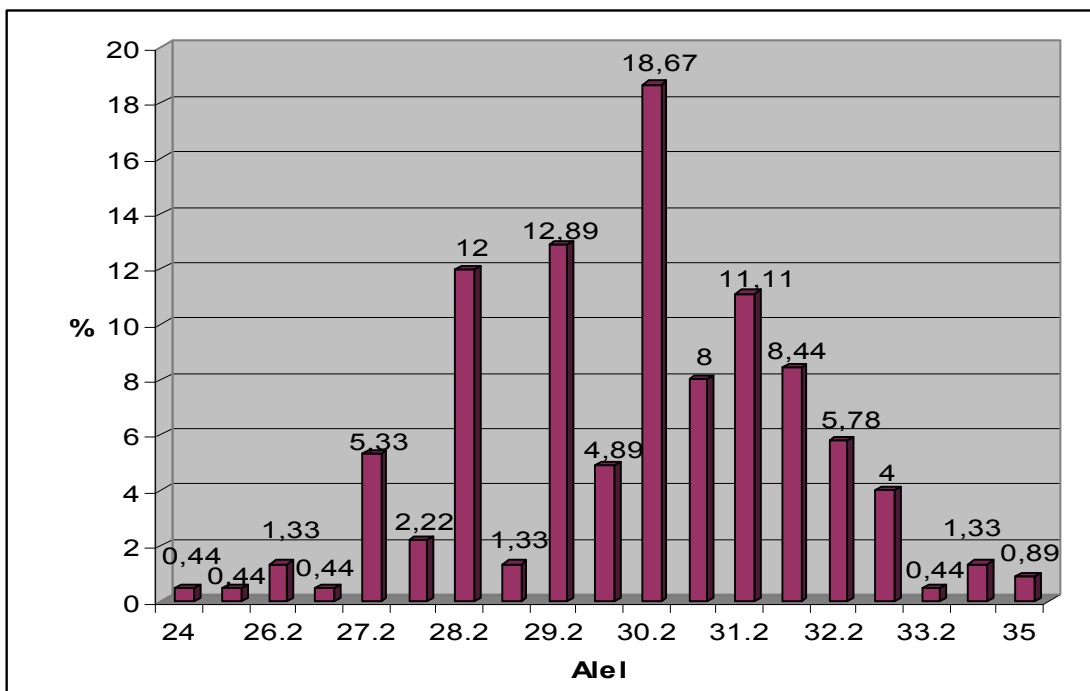
Polimorfnost lokusa iznosi 0,84, heterozigotnost 85,26%, moć isključivanja 70%, indeks očinstva 0,07, moć diskriminacije za ženske osobe 96,14%, a za muške osobe 85,26% (Tabela 22).

Prosečna šansa isključivanja, prema formuli Krugera, iznosi 70,55%, prema formuli Kišide 83,55%, a prema formulama Desmaraisa 83,57%, odnosno 73,10% (Tabela 22).

LOKUS DXS10101

Tabela 23. Frekvencija alela u lokusu DXS10101

ALEL	BROJ ALELA	FREKVENCIJA	%
24	1	0,0044	0,44
24.2	1	0,0044	0,44
26.2	3	0,0133	1,33
27	1	0,0044	0,44
27.2	12	0,0533	5,33
28	5	0,0222	2,22
28.2	27	0,1200	12
29	3	0,0133	1,33
29.2	29	0,1289	12,89
30	11	0,0489	4,89
30.2	42	0,1867	18,67
31	18	0,0800	8
31.2	25	0,1111	11,11
32	19	0,0844	8,44
32.2	13	0,0578	5,78
33	9	0,0400	4
33.2	1	0,0044	0,44
34	3	0,0133	1,33
35	2	0,0089	0,89



Grafikon 6. Frekvencija alela u lokusu DXS10101

Tabela 24. Opšti i forenzički statistički parametri u lokusu DXS10101

General	
Polymorphism information content (PIC):	0.888251
Homozygotie (h):	0.103092
Heterozygotie (HET):	0.896908
Power of Exclusion (PE):	0.789108
Paternity Index (PI):	0.051546
Power of Discrimination	
PD female:	0.980715
PD male:	0.896908
Mean paternity exclusion chance	
MEC Krüger:	0.792791
MEC Kishida:	0.887924
MEC Desmarais:	0.888251
MEC Desmarais Duo:	0.807223

Analiziranjem lokusa DXS10101, pronađeno je ukupno 19 alela. Najučestaliji je alel 30.2, koji je prisutan kod 18,67% populacije Vojvodine, a najređi aleli 24, 24.2, 27 i 33.2 sa učestalošću od 0,44% (Tabela 23, Grafikon 6).

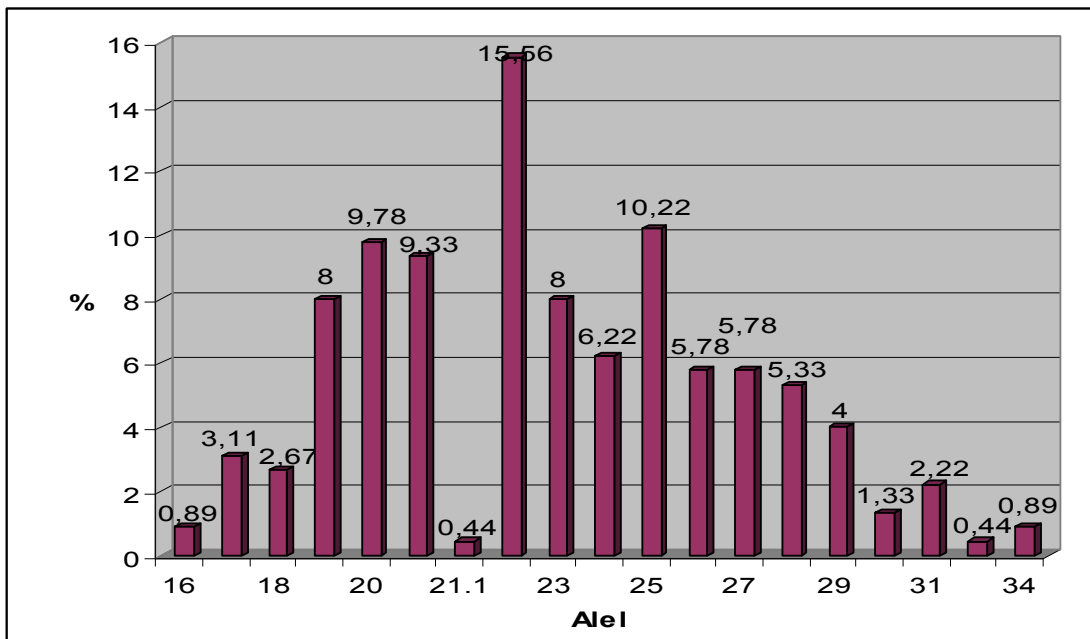
Polimorfnost lokusa iznosi 0,89, heterozigotnost 89,69%, moć isključivanja 78,91%, indeks očinstva 0,05, moć diskriminacije za ženske osobe 98,07%, a za muške osobe 89,69% (Tabela 24).

Prosečna šansa isključivanja, prema formuli Krugera, iznosi 79,28%, prema formuli Kišide 88,79%, a prema formulama Desmaraisa 88,83%, odnosno 80,72% (Tabela 24).

LOKUS DXS10135

Tabela 25. Frekvencija alela u lokusu DXS10135

ALEL	BROJ ALELA	FREKVENCIJA	%
16	2	0,0089	0,89
17	7	0,0311	3,11
18	6	0,0267	2,67
19	18	0,0800	8
20	22	0,0978	9,78
21	21	0,0933	9,33
21.1	1	0,0044	0,44
22	35	0,1556	15,56
23	18	0,0800	8
24	14	0,0622	6,22
25	23	0,1022	10,22
26	13	0,0578	5,78
27	13	0,0578	5,78
28	12	0,0533	5,33
29	9	0,0400	4
30	3	0,0133	1,33
31	5	0,0222	2,22
32	1	0,0044	0,44
34	2	0,0089	0,89



Grafikon 7. Frekvencija alela u lokusu DXS10135

Tabela 26. Opšti i forenzički statistički parametri u lokusu DXS10135

General	
Polymorphism information content (PIC):	0.910797
Homozygotie (h):	0.083264
Heterozygotie (HET):	0.916736
Power of Exclusion (PE):	0.829722
Paternity Index (PI):	0.041632
Power of Discrimination	
PD female:	0.987128
PD male:	0.916736
Mean paternity exclusion chance	
MEC Krüger:	0.831743
MEC Kishida:	0.910689
MEC Desmarais:	0.910797
MEC Desmarais Duo:	0.841984

Analiziranjem lokusa DXS10135, pronađeno je ukupno 19 alela. Najučestaliji je alel 22, koji je prisutan kod 15,56% populacije Vojvodine, a najređi aleli 21.1 i 32 sa učestalošću od 0,44% (Tabela 25, Grafikon 7).

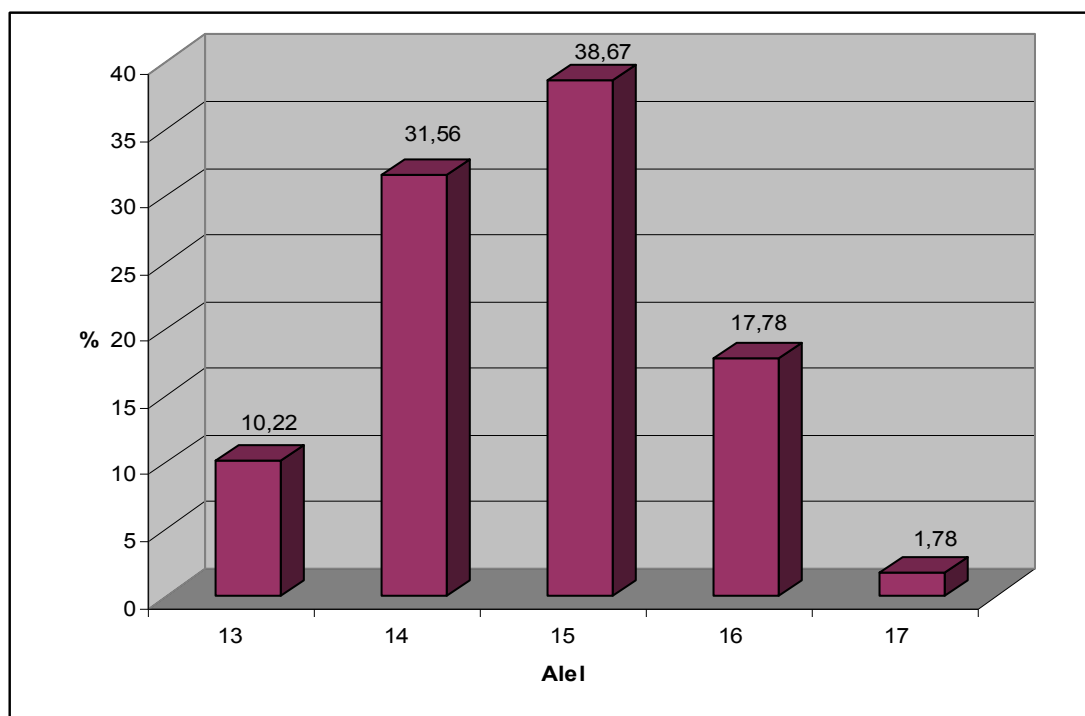
Polimorfnost lokusa iznosi 0,91, heterozigotnost 91,67%, moć isključivanja 82,97%, indeks očinstva 0,04, moć diskriminacije za ženske osobe 98,71%, a za muške osobe 91,67% (Tabela 26).

Prosečna šansa isključivanja, prema formuli Krugera, iznosi 83,17%, prema formuli Kišide 91,07%, a prema formulama Desmaraisa 91,08%, odnosno 84,20% (Tabela 26).

LOKUS DXS7423

Tabela 27. Frekvencija alela u lokusu DXS7423

ALEL	BROJ ALELA	FREKVENCIJA	%
13	23	0,1022	10,22
14	71	0,3156	31,56
15	87	0,3867	38,67
16	40	0,1778	17,78
17	4	0,0178	1,78



Grafikon 8. Frekvencija alela u lokusu DXS7423

Tabela 28. Opšti i forenzički statistički parametri u lokusu DXS7423

General	
Polymorphism information content (PIC):	0.656982
Homozygotie (h):	0.291452
Heterozygotie (HET):	0.708548
Power of Exclusion (PE):	0.441608
Paternity Index (PI):	0.145726
Power of Discrimination	
PD female:	0.863490
PD male:	0.708548
Mean paternity exclusion chance	
MEC Krüger:	0.457876
MEC Kishida:	0.656982
MEC Desmarais:	0.656982
MEC Desmarais Duo:	0.513021

Analiziranjem lokusa DXS7423, pronađeno je ukupno 5 alela. Najučestaliji alel je 15, koji je prisutan kod 38,67% populacije Vojvodine, a najređi alel 17, sa učestalošću od 1,78% (Tabela 27, Grafikon 8).

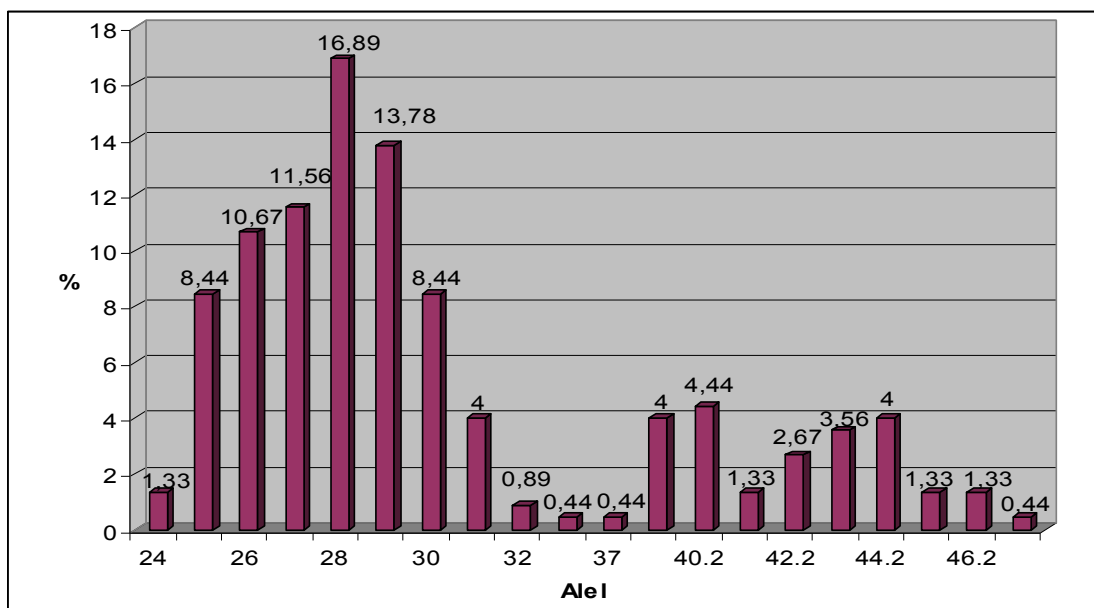
Polimorfnost lokusa iznosi 0,66, heterozigotnost 70,86%, moć isključivanja 44,16%, indeks očinstva 0,14, moć diskriminacije za ženske osobe 86,35%, a za muške osobe 70,86% (Tabela 28).

Prosečna šansa isključivanja, prema formuli Krugera, iznosi 45,79%, prema formuli Kišide 65,70%, a prema formulama Desmaraisa 65,70%, odnosno 51,30% (Tabela 28).

LOKUS DXS10146

Tabela 29. Frekvencija alela u lokusu DXS10146

ALEL	BROJ ALELA	FREKVENCIJA	%
24	3	0,0133	1,33
25	19	0,0844	8,44
26	24	0,1067	10,67
27	26	0,1156	11,56
28	38	0,1689	16,89
29	31	0,1378	13,78
30	19	0,0844	8,44
31	9	0,0400	4
32	2	0,0089	0,89
32.2	1	0,0044	0,44
37	1	0,0044	0,44
39.2	9	0,0400	4
40.2	10	0,0444	4,44
41.2	3	0,0133	1,33
42.2	6	0,0267	2,67
43.2	8	0,0356	3,56
44.2	9	0,0400	4
45.2	3	0,0133	1,33
46.2	3	0,0133	1,33
47.2	1	0,0044	0,44



Grafikon 9. Frekvencija alela u lokusu DXS10146

Tabela 30. Opšti i forenzički statistički parametri u lokusu DXS10146

General	
Polymorphism information content (PIC):	0.896254
Homozygotie (h):	0.096107
Heterozygotie (HET):	0.903893
Power of Exclusion (PE):	0.803379
Paternity Index (PI):	0.048054
Power of Discrimination	
PD female:	0.983125
PD male:	0.903893
Mean paternity exclusion chance	
MEC Krüger:	0.806739
MEC Kishida:	0.896037
MEC Desmarais:	0.896254
MEC Desmarais Duo:	0.819536

Analiziranjem lokusa DXS10146, pronađeno je ukupno 20 alela. Najučestaliji je alel 28, koji je prisutan kod 16,89% populacije Vojvodine, a najređi aleli 32.2, 37 i 47.2 sa učestalošću od 0,44% (Tabela 29, Grafikon 9).

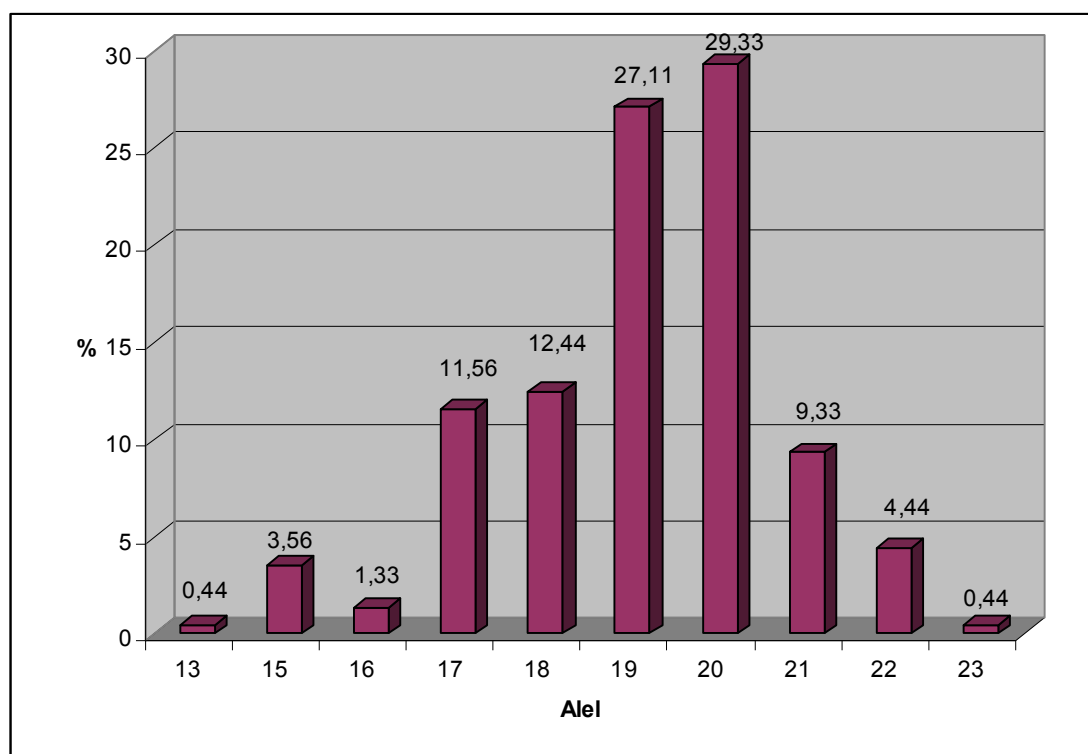
Polimorfnost lokusa iznosi 0,90, heterozigotnost 90,39%, moć isključivanja 80,34%, indeks očinstva 0,04, moć diskriminacije za ženske osobe 98,31%, a za muške osobe 90,39% (Tabela 30).

Prosečna šansa isključivanja, prema formuli Krugera, iznosi 80,67%, prema formuli Kišide 89,60%, a prema formulama Desmaraisa 89,63%, odnosno 81,95% (Tabela 30).

LOKUS DXS10079

Tabela 31. Frekvencija alela u lokusu DXS10079

ALEL	BROJ ALELA	FREKVENCIJA	%
13	1	0,0044	0,44
15	8	0,0356	3,56
16	3	0,0133	1,33
17	26	0,1156	11,56
18	28	0,1244	12,44
19	61	0,2711	27,11
20	66	0,2933	29,33
21	21	0,0933	9,33
22	10	0,0444	4,44
23	1	0,0044	0,44



Grafikon 10. Frekvencija alela u lokusu DXS10079

Tabela 32. Opšti i forenzički statistički parametri u lokusu DXS10079

General	
Polymorphism information content (PIC):	0.772576
Homozygotie (h):	0.200518
Heterozygotie (HET):	0.799482
Power of Exclusion (PE):	0.598079
Paternity Index (PI):	0.100259
Power of Discrimination	
PD female:	0.932886
PD male:	0.799482
Mean paternity exclusion chance	
MEC Krüger:	0.613244
MEC Kishida:	0.772345
MEC Desmarais:	0.772576
MEC Desmarais Duo:	0.648537

Analiziranjem lokusa DXS10079, pronađeno je ukupno 10 alela. Najučestaliji je alel 20, koji je prisutan kod 29,33% populacije Vojvodine, a najređi aleli 13 i 23 sa učestalošću od 0,44% (Tabela 31, Grafikon 10).

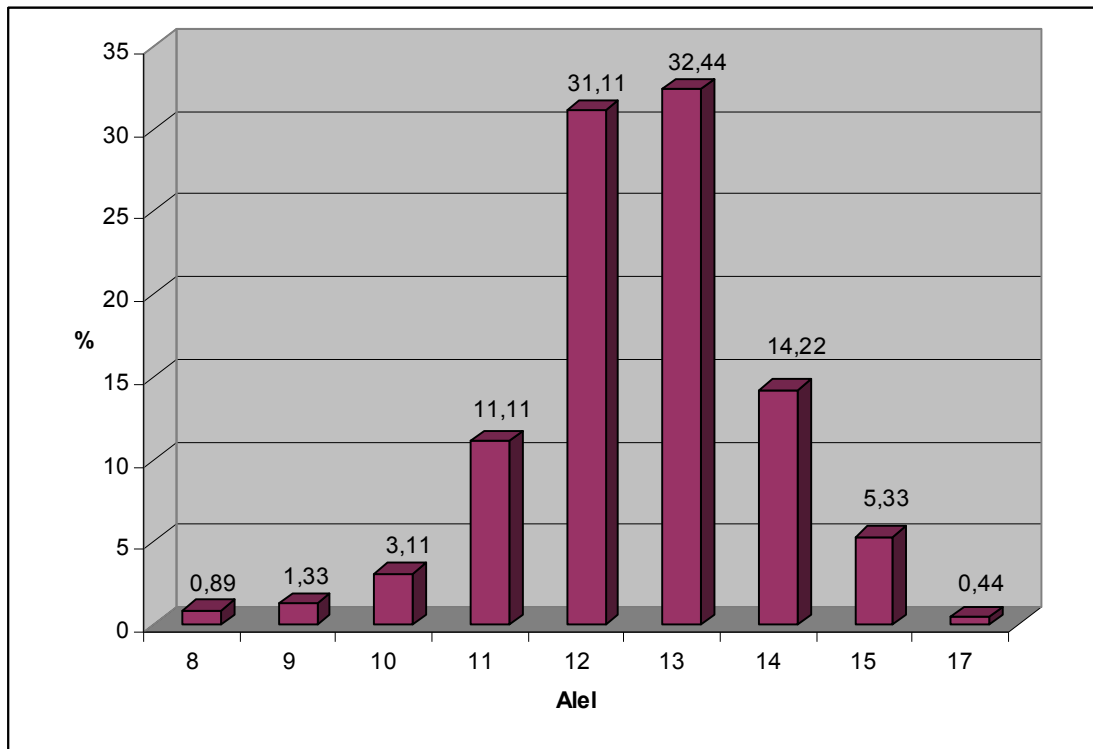
Polimorfnost lokusa iznosi 0,77, heterozigotnost 79,95%, moć isključivanja 59,81%, indeks očinstva 0,1, moć diskriminacije za ženske osobe 93,29%, a za muške osobe 79,95% (Tabela 32).

Prosečna šansa isključivanja, prema formuli Krugera, iznosi 61,32%, prema formuli Kišide 77,24%, a prema formulama Desmaraisa 77,26%, odnosno 64,85% (Tabela 32).

LOKUS HPRTB

Tabela 33. Frekvencija alela u lokusu HPRTB

ALEL	BROJ ALELA	FREKVENCIJA	%
8	2	0,0089	0,89
9	3	0,0133	1,33
10	7	0,0311	3,11
11	25	0,1111	11,11
12	70	0,3111	31,11
13	73	0,3244	32,44
14	32	0,1422	14,22
15	12	0,0533	5,33
17	1	0,0044	0,44



Grafikon 11. Frekvencija alela u lokusu HPRTB

Tabela 34. Opšti i forenzički statistički parametri u lokusu HPRTB

General	
Polymorphism information content (PIC):	0.725384
Homozygotie (h):	0.238666
Heterozygotie (HET):	0.761334
Power of Exclusion (PE):	0.529356
Paternity Index (PI):	0.119333
Power of Discrimination	
PD female:	0.907089
PD male:	0.761334
Mean paternity exclusion chance	
MEC Krüger:	0.548650
MEC Kishida:	0.725150
MEC Desmarais:	0.725384
MEC Desmarais Duo:	0.591347

Analiziranjem lokusa HPRTB, pronađeno je ukupno 9 alela. Najučestaliji je alel 13, koji je prisutan kod 32,44% populacije Vojvodine, a najređi alel 17 sa učestalošću od 0,44% (Tabela 33, Grafikon 11).

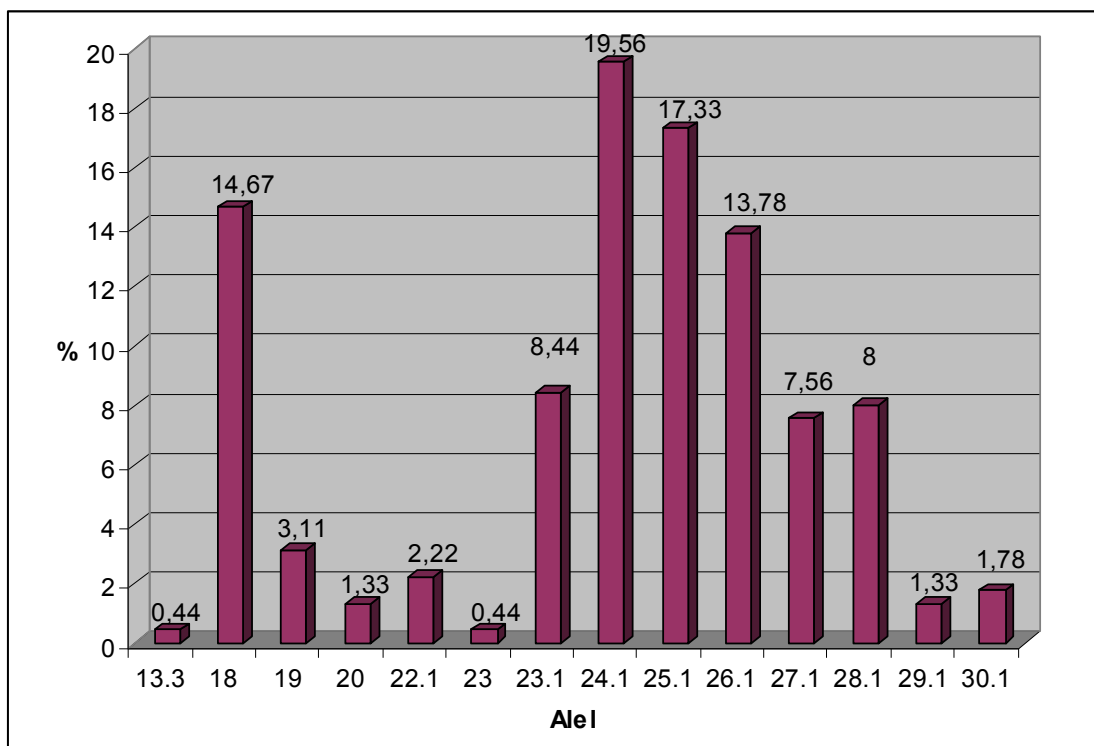
Polimorfnost lokusa iznosi 0,73, heterozigotnost 76,13%, moć isključivanja 52,94%, indeks očinstva 0,12, moć diskriminacije za ženske osobe 90,71%, a za muške osobe 76,13% (Tabela 34).

Prosečna šansa isključivanja, prema formuli Krugera, iznosi 54,87%, prema formuli Kišide 72,52%, a prema formulama Desmaraisa 72,53%, odnosno 59,14% (Tabela 34).

LOKUS DXS10148

Tabela 35. Frekvencija alela u lokusu DXS10148

ALEL	BROJ ALELA	FREKVENCIJA	%
13.3	1	0,0044	0,44
18	33	0,1467	14,67
19	7	0,0311	3,11
20	3	0,0133	1,33
22.1	5	0,0222	2,22
23	1	0,0044	0,44
23.1	19	0,0844	8,44
24.1	44	0,1956	19,56
25.1	39	0,1733	17,33
26.1	31	0,1378	13,78
27.1	17	0,0756	7,56
28.1	18	0,0800	8
29.1	3	0,0133	1,33
30.1	4	0,0178	1,78



Grafikon 12. Frekvencija alela u lokusu DXS10148

Tabela 36. Opšti i forenzički statistički parametri u lokusu DXS10148

General	
Polymorphism information content (PIC):	0.856150
Homozygotie (h):	0.130210
Heterozygotie (HET):	0.869790
Power of Exclusion (PE):	0.734221
Paternity Index (PI):	0.065105
Power of Discrimination	
PD female:	0.969406
PD male:	0.869790
Mean paternity exclusion chance	
MEC Krüger:	0.738375
MEC Kishida:	0.856039
MEC Desmarais:	0.856150
MEC Desmarais Duo:	0.759639

Analiziranjem lokusa DXS10148, pronađeno je ukupno 14 alela. Najučestaliji je alel 24.1, koji je prisutan kod 19,56% populacije Vojvodine, a najređi aleli 13.3 i 23 sa učestalošću od 0,44% (Tabela 35, Grafikon 12).

Polimorfnost lokusa iznosi 0,86, heterozigotnost 86,98%, moć isključivanja 73,42%, indeks očinstva 0,07, moć diskriminacije za ženske osobe 96,94%, a za muške osobe 86,98% (Tabela 36).

Prosečna šansa isključivanja, prema formuli Krugera, iznosi 73,84%, prema formuli Kišide 85,60%, a prema formulama Desmaraisa 85,62%, odnosno 75,96% (Tabela 36).

Tabela 37. Zbirna tabela frekvencija alela i statističkih parametara

	DXS10103	DXS8378	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135	DXS7423	DXS10146	DXS10079	HPRTB	DXS10148
7					0,0711							
8					0,1778						0,0089	
9		0,0356			0,0044						0,0133	
10		0,3644			0,0044						0,0311	
11		0,3467	0,0089								0,1111	
12		0,2044	0,0533								0,3111	
13		0,0489	0,2667		0,0044			0,1022		0,0044	0,3244	
13.3												0,0044
14	0,0044		0,3822		0,0133			0,3156			0,1422	
15	0,0178		0,2444		0,0756			0,3867		0,0356	0,0533	
16	0,0933		0,0356		0,1733		0,0089	0,1778		0,0133		
16.2					0,0311							
17	0,1022		0,0089		0,2222		0,0311	0,0178		0,1156	0,0044	
18	0,2000				0,1422		0,0267			0,1244		0,1467
19	0,4044				0,0622		0,0800			0,2711		0,0311
20	0,1378				0,0178		0,0978			0,2933		0,0133
21	0,0400						0,0933			0,0933		
21.1							0,0044					
22							0,1556			0,0444		
22.1												0,0222
23							0,0800			0,0044		0,0044
23.1												0,0844
24						0,0044	0,0622		0,0133			
24.1												0,1956
24.2						0,0044						
25							0,1022		0,0844			
25.1												0,1733
26							0,0578		0,1067			
26.1												0,1378
26.2						0,0133						
27						0,0044	0,0578		0,1156			
27.1												0,0756
27.2					0,0533							
28						0,0222	0,0533		0,1689			
28.1												0,0800
28.2					0,1200							
29					0,0133	0,0400			0,1378			
29.1												0,0133
29.2					0,1289							
30					0,0489	0,0133			0,0844			
30.1												0,0178
30.2						0,1867						
31				0,0222		0,0800	0,0222		0,0400			
31.2						0,1111						
32				0,0178		0,0844	0,0044		0,0089			
32.2						0,0578			0,0044			
33				0,0622		0,0400						
33.2						0,0044						
34				0,1511		0,0133	0,0089					
35				0,2489		0,0089						
36				0,1867								
37				0,1422					0,0044			
37.2				0,0044								
38				0,0489								
38.2				0,0044								
39.2									0,0400			
39.3				0,0044								
40.2									0,0444			
40.3				0,0089								
41.2									0,0133			
42.2									0,0267			
42.3				0,0044								
43.2									0,0356			
44.2									0,0400			
45.2									0,0133			
46.2									0,0133			
47.2									0,0044			
PIC	0,7259	0,6463	0,6697	0,8373	0,8357	0,8882	0,9108	0,6570	0,8962	0,7726	0,7254	0,8562
HET	0,7564	0,7016	0,7188	0,8529	0,8526	0,8969	0,9167	0,7085	0,9039	0,7995	0,7613	0,8698
PE	0,5208	0,4307	0,4579	0,7006	0,7000	0,7891	0,8297	0,4416	0,8034	0,5981	0,5294	0,7342
PI	0,1218	0,1492	0,1406	0,0735	0,0737	0,0515	0,0416	0,1457	0,0480	0,1002	0,1193	0,0651
PDF	0,9102	0,8557	0,8718	0,9627	0,9614	0,9807	0,9871	0,8635	0,9831	0,9329	0,9071	0,9694
PDM	0,7564	0,7016	0,7188	0,8529	0,8526	0,8969	0,9167	0,7085	0,9039	0,7995	0,7613	0,8698
MEC _{KRU}	0,5544	0,4445	0,4734	0,6094	0,7055	0,7928	0,8317	0,4579	0,8067	0,6132	0,5486	0,7384
MEC _{KIS}	0,7258	0,6463	0,6697	0,7327	0,8355	0,8879	0,9107	0,6570	0,8960	0,7723	0,7252	0,8560
MEC _{DES}	0,7259	0,6463	0,6697	0,8373	0,8357	0,8882	0,9108	0,6570	0,8962	0,7726	0,7254	0,8562
MEC _{DESUG}	0,5915	0,5019	0,5272	0,7344	0,7309	0,8072	0,8420	0,5130	0,8195	0,6485	0,5913	0,7596

6.4. INTERPOPULACIONA POREĐENJA NA OSNOVU GENETIČKE DISTANCE

Za međusobno poređenje, odnosno određivanje genetičke distance između populacija, izračunate su F_{st} vrednosti. U Tabeli 38. predstavljene su F_{st} vrednosti za 22 populacije kod kojih je izvršena analiza 8 mikrosatelitskih lokusa smeštenih na X hromozomu, a na isti način izračunate su i F_{st} vrednosti za 17 populacija kod kojih je izvršena analiza 12 lokusa X hromozoma.

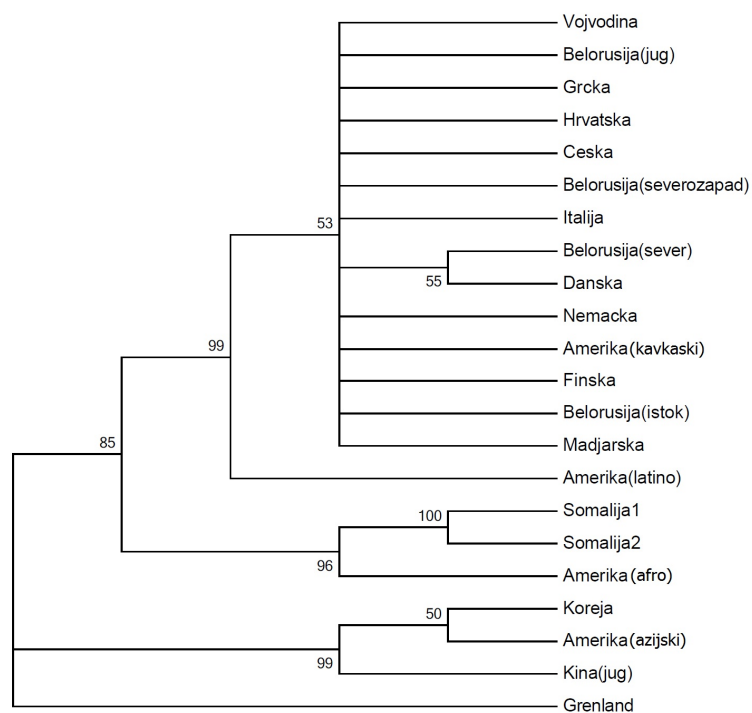
Vizuelni prikaz odnosa ovih populacija dat je pomoću dve metode izrade dendrograma, UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic mean*) i NJ (*neighbor-joining*) metode, i to posebno za populacije kod kojih je analizirano 8 (Slike 20, 21), odnosno 12 lokusa (Slike 22, 23). Takođe, vizuelni prikaz je dat i pomoću koordinatnog sistema PCoA, posebno za populacije kod kojih je analizirano 8 (Slika 24), odnosno 12 lokusa (Slika 25). Korišćenje većeg broja različitih grafičkih prikaza pri poređenju populacija, preporučuje se iz razloga što koriste različite načine obrade podataka, te se može desiti da krajnji rezultat ne bude potpuno isti za svaki prikaz. Što se dobiju sličniji prikazi, verodostojnost izvučenih zaključaka je veća.

Pomoću *exact* testa, izvršeno je međusobno poređenje frekvencije alela lokusa populacije Vojvodine, sa istim lokusima u populacijama susednih država, Hrvatske i Bosne i Hercegovine. Ustanovljeno je da ne postoji statistički značajna razlika u frekvenciji alela između pomenutih populacija. S druge strane, statistički značajne razlike, u odnosu na populaciju Vojvodine, zabeležene su za lokus DXS7423 kod populacija Južne Koreje i Kine, kao i za lokus DXS8378 kod populacije Grenlanda.

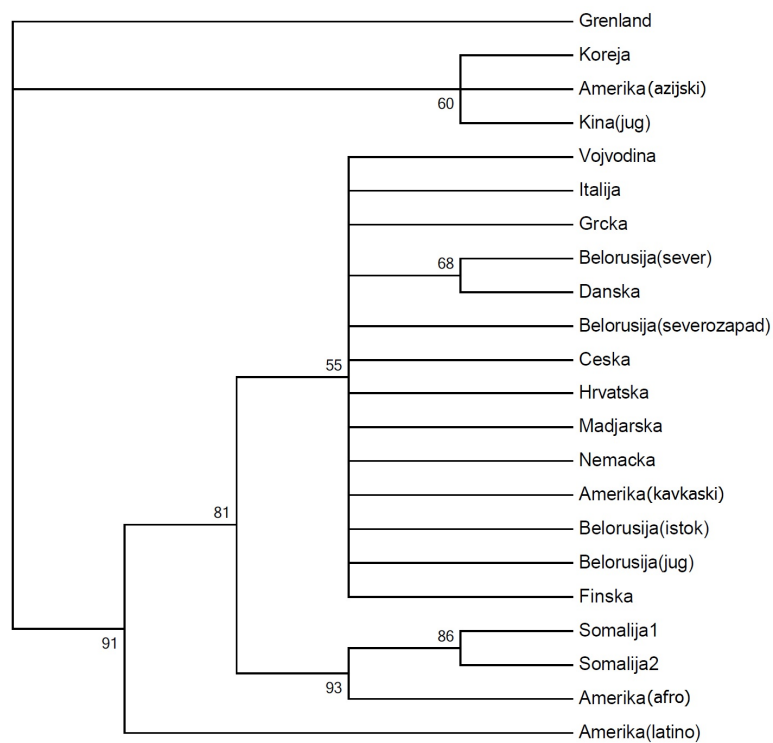
Tabela 38 Rezultati Fst vrednosti za populacije analizirane PCR kitom Mentype Argus X-8

	Voj	Hrv	Kor	Fin	Som1	Nem	Ita	Bels	Belsz	Beli	Belj	Madj	Kina	Anc	Ama	Amb	Aml	Ces	Gre	Dan	Som2	Grc
Voj	0,000	0,001	0,025	0,003	0,016	0,001	0,001	0,002	0,002	0,003	0,001	0,003	0,022	0,019	0,021	0,001	0,005	0,001	0,055	0,003	0,014	0,001
Hrv	0,001	0,000	0,025	0,002	0,016	0,001	0,000	0,001	0,000	0,001	0,002	0,001	0,022	0,018	0,023	0,000	0,005	0,000	0,057	0,000	0,015	0,002
Kor	0,025	0,000	0,018	0,018	0,035	0,03	0,028	0,027	0,028	0,022	0,022	0,028	0,003	0,044	0,001	0,027	0,011	0,026	0,037	0,029	0,032	0,028
Fin	0,003	0,002	0,018	0,000	0,017	0,003	0,002	0,003	0,003	0,002	0,001	0,004	0,018	0,021	0,015	0,003	0,002	0,002	0,045	0,002	0,015	0,003
Som1	0,016	0,016	0,035	0,017	0,000	0,016	0,015	0,018	0,014	0,017	0,017	0,015	0,028	0,007	0,028	0,013	0,015	0,015	0,055	0,020	0,001	0,015
Nem	0,001	0,001	0,03	0,003	0,016	0,000	0,002	0,002	0,001	0,002	0,003	0,003	0,027	0,018	0,026	0,001	0,007	0,001	0,057	0,001	0,015	0,002
Ita	0,001	0,000	0,028	0,002	0,015	0,002	0,000	0,002	0,000	0,002	0,002	0,003	0,025	0,016	0,026	0,002	0,005	0,001	0,058	0,000	0,016	0,001
Bels	0,002	0,001	0,027	0,003	0,018	0,002	0,002	0,000	0,001	0,002	0,002	0,003	0,025	0,019	0,025	0,002	0,006	0,001	0,054	0,000	0,018	0,003
Belsz	0,002	0,000	0,028	0,003	0,014	0,001	0,000	0,001	0,000	0,002	0,001	0,002	0,025	0,016	0,024	0,002	0,006	0,000	0,058	0,001	0,016	0,001
Beli	0,003	0,001	0,022	0,002	0,017	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,001	0,004	0,021	0,021	0,019	0,002	0,005	0,001	0,050	0,003	0,017	0,003
Belj	0,001	0,002	0,022	0,001	0,017	0,003	0,002	0,002	0,001	0,001	0,000	0,003	0,021	0,022	0,019	0,003	0,004	0,002	0,050	0,003	0,015	0,002
Madj	0,003	0,001	0,028	0,004	0,015	0,003	0,003	0,003	0,002	0,004	0,003	0,000	0,026	0,017	0,026	0,002	0,007	0,002	0,058	0,003	0,015	0,003
Kina	0,022	0,022	0,003	0,018	0,028	0,027	0,025	0,025	0,025	0,021	0,021	0,026	0,000	0,036	0,001	0,022	0,011	0,023	0,038	0,029	0,025	0,027
Anc	0,019	0,018	0,044	0,021	0,007	0,018	0,016	0,019	0,016	0,021	0,022	0,017	0,036	0,000	0,038	0,016	0,016	0,017	0,062	0,02	0,011	0,019
Ama	0,021	0,023	0,001	0,015	0,028	0,026	0,026	0,025	0,024	0,019	0,019	0,026	0,001	0,038	0,000	0,024	0,01	0,022	0,033	0,028	0,025	0,025
Amb	0,001	0,000	0,027	0,003	0,013	0,001	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,002	0,022	0,016	0,024	0,000	0,005	0,001	0,056	0,002	0,012	0,002
Aml	0,005	0,005	0,011	0,002	0,015	0,007	0,005	0,006	0,006	0,005	0,004	0,007	0,011	0,016	0,01	0,005	0,000	0,005	0,039	0,006	0,013	0,006
Ces	0,001	0,000	0,026	0,002	0,015	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	0,002	0,002	0,023	0,017	0,022	0,001	0,005	0,000	0,055	0,000	0,015	0,002
Gre	0,055	0,057	0,037	0,045	0,055	0,057	0,058	0,054	0,058	0,050	0,050	0,058	0,038	0,062	0,033	0,056	0,039	0,055	0,000	0,06	0,051	0,056
Dan	0,003	0,000	0,029	0,002	0,020	0,001	0,000	0,000	0,001	0,003	0,003	0,003	0,029	0,02	0,028	0,002	0,006	0,000	0,06	0,000	0,02	0,002
Som2	0,014	0,015	0,032	0,015	0,001	0,015	0,016	0,018	0,016	0,017	0,015	0,015	0,025	0,011	0,025	0,012	0,013	0,015	0,051	0,02	0,000	0,015
Grc	0,001	0,002	0,028	0,003	0,015	0,002	0,001	0,003	0,001	0,003	0,002	0,003	0,027	0,019	0,025	0,002	0,006	0,002	0,056	0,002	0,015	0,000

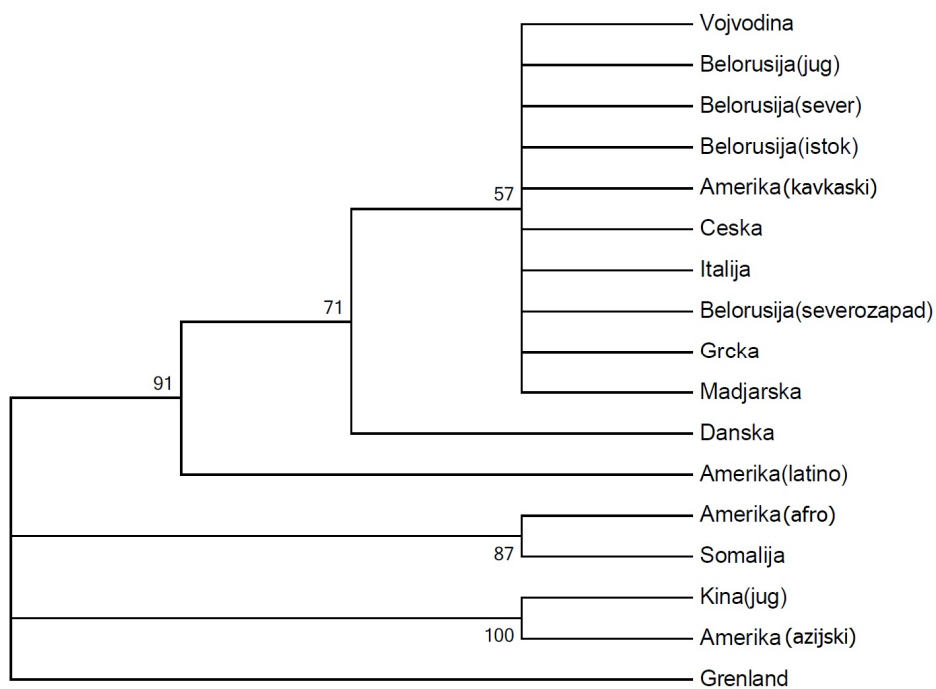
Skraćeni nazivi populacija: Voj-Vojvodina,¹⁴⁴ Hrv-Hrvatska¹⁴⁴, Kor-Juzna Koreja¹⁴⁵, Fin-Finska¹⁴⁶, Som1-Somalija¹⁴⁶, Nem-Nemačka¹⁴⁷, Ita-Italija¹⁴⁸, Bels/Belsz/Beli/Belj-Belorusija (sever/severozapad/istok/jug)¹⁴⁹, Madj-Madarska¹⁵⁰, Kin-Kina¹⁵¹, Amc/Ama/Amb/Aml-Amerika afroamerikanci /azijski/kavaski/latino¹⁵², Ces-Česka¹⁵³, Gre-Grenland¹⁵⁴, Dan-Danska¹⁵⁴, Som2-Somalija¹⁵⁴, Grc-Grčka.¹⁵⁵



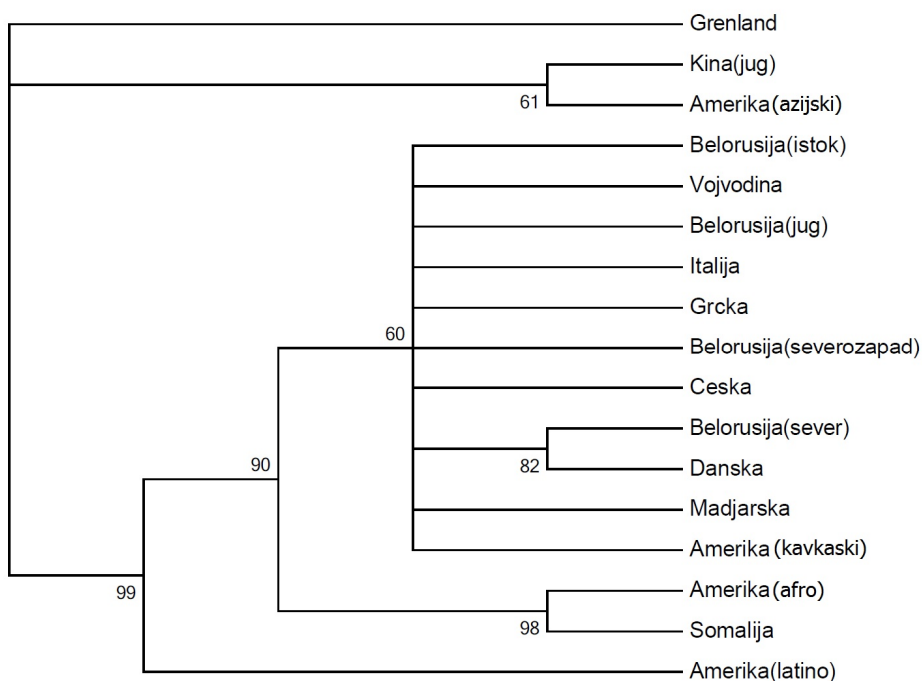
Slika 20. Dendrogram konstruisan po UPGMA metodi za populacije analizirane PCR kitom Mentype Argus X-8



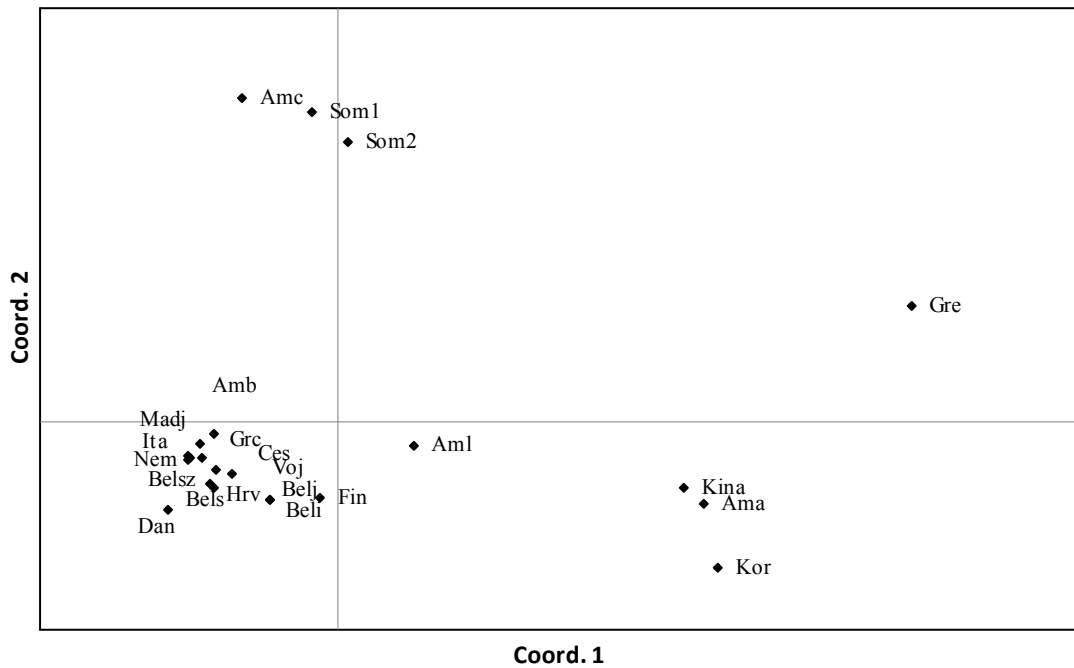
Slika 21. Dendrogram konstruisan po NJ metodi za populacije analizirane PCR kitom Mentype Argus X-8



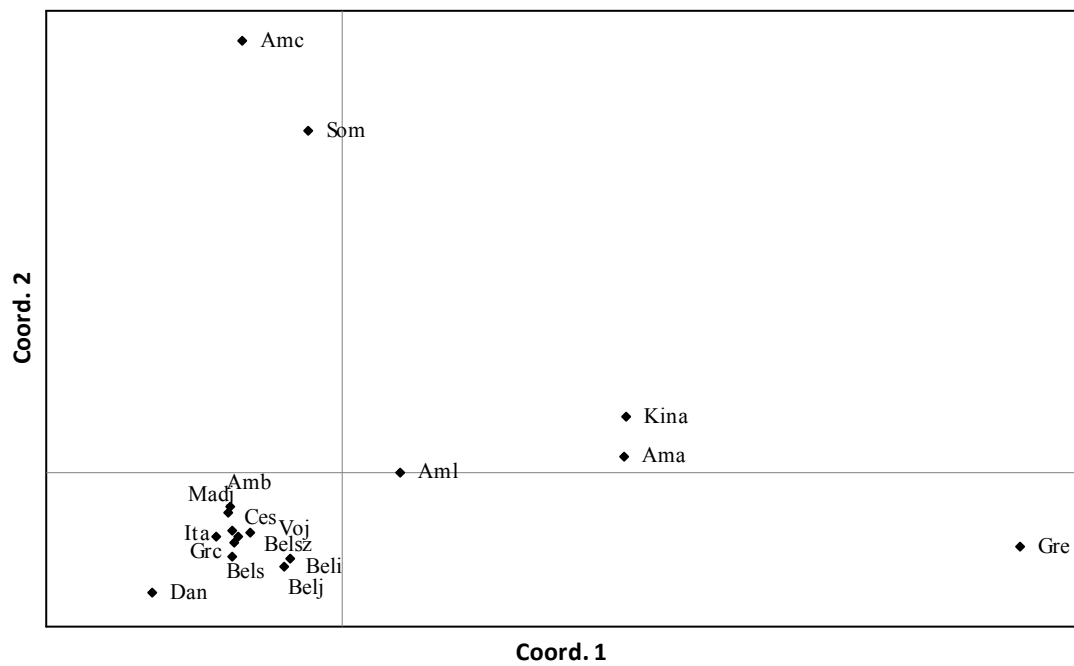
Slika 22. Dendrogram konstruisan po UPGMA metodi za populacije analizirane PCR kitom Mentype Argus X-12



Slika 23. Dendrogram konstruisan po NJ metodi za populacije analizirane PCR kitom Mentype Argus X-12



Slika 24. PCoA konstruisan za populacije analizirane PCR kitom Mentype Argus X-8



Slika 25. PCoA konstruisan za populacije analizirane PCR kitom Mentype Argus X-12

7. DISKUSIJA

Rezultati dosadašnjih ispitivanja ukazuju na to, da lokus koji je manje informativan u jednoj populaciji, u drugoj populaciji može biti mnogo značajniji i informativniji. Upravo zbog toga je neophodno utvrditi frekvenciju alela za svaki lokus, u svakoj populaciji, da bi, na osnovu dobijenih podataka populacionih studija, bilo moguće izračunati forenzičke parametre, a potom ih i koristiti na određenoj teritoriji.

Stepen polimorfizma, odnosno informativnost određenog markera, zavisi od broja alela prisutnih na lokusu, kao i od načina na koji su ti aleli raspoređeni. U našem istraživanju, najveći broj alela, ukupno 20, pronađen je na lokusu DXS10146. Međutim, iako sadrži najviše alela, ovaj lokus nije istovremeno i najinformativniji, već je to lokus DXS10135 sa svojih 19 alela. Razlog za to predstavlja ravnomerniji raspored u frekvencijama alela na ovom lokusu, u odnosu na prethodni. Najniži stepen polimorfizma pokazao je lokus DXS8378. Najučestaliji je alel 19, koji pripada lokusu DXS10103, sa frekvencijom od 40,44%.

U posmatranom uzorku populacije Vojvodine, za ispitivane lokuse, stepen polimorfizma kreće se u rasponu 0,6463 - 0,9108, heterozigotnost 70,16 - 91,67%, moć isključivanja 43,07 - 82,97%, moć diskriminacije za ženske osobe 85,57 - 98,71%, a za muške osobe 70,16 - 91,67%.

Ispitivanje populacije centralnog dela Hrvatske¹⁴⁴ izvršeno je pomoću komercijalnog kita Mentype Argus X-8, tako da se osam markera poklapa sa markerima iz našeg istraživanja i moguće je uporediti podatke populacionih studija. Dobijeni rezultati pomenute studije pokazuju da su, na lokusu DXS10135 među najučestalijim aleli 27, 25, 26, 24, 23, 19 i 21 (od pronađenih 25), dok su u našoj populaciji najučestaliji aleli istog lokusa 22, 25, 20, 21, 19, 23 i 24 (od pronađenih 19), respektivno. Na lokusu DXS8378, u obe populacije, pronađeno je po 5 alela, pri čemu su aleli 10 i 11 najučestaliji. Na lokusu DXS7132, u obe populacije, pronađeno je po 7 alela, pri čemu je najučestaliji alel 14, a sledi ga alel 13. Na lokusu DXS10074, u obe populacije, pronađeno je po 13 alela, pri čemu je najučestaliji alel 17. Na lokusu HPRTB, u obe populacije, pronađeno je po 9 alela, pri čemu su najučestaliji aleli 12 i 13. Na lokusu DXS10101, u obe populacije, najučestaliji aleli su 30.2, 29.2, 28.2, i 31.2, respektivno. Na lokusu DXS10134 najučestaliji aleli su 36 i 35, od pronađenih 23 u

populaciji Hrvatske, odnosno pronađenih 13 u našoj populaciji. Na lokusu DXS7423 u obe populacije pronađeno je po 5 alela pri čemu su najučestaliji aleli 15 i 14.

Poređenjem pojedinačnih lokusa populacije Vojvodine i Hrvatske, pomoću *exact* testa, ustanovljeno je da ne postoji statistički značajna razlika u frekvenciji alela. Ovo je, donekle, i očekivano, imajući u vidu F_{st} vrednosti od 0,001 između ovih populacija. Za vrednosti ispod 0,05 smatra se da ukazuju na nisku genetičku diferencijaciju između dve populacije, tako da dobijena vrednost ukazuje na veoma nisku genetičku diferencijaciju između populacija Vojvodine i Hrvatske.

U uzorku populacije Hrvatske, za 8 ispitivanih lokusa, heterozigotnost se kretala između 67,68 - 95,96%, moć diskriminacije za osobe ženskog pola 84,47 - 99,18%, za osobe muškog pola 69,22 - 93,45%, stepen polimorfizma 0,63 - 0,93 i moć isključivanja 41,63 - 86,63%. Najpolimorfiji je lokus DXS10135, međutim najmanje polimorfan lokus nije isti, u njihovoj studiji je to DXS7423.

U još jednom od istraživanja na teritoriji Hrvatske¹⁵⁶, korišten je komercijalni kit sa pet X-STR markera, od kojih se samo lokus HPRTB poklapa sa markerima iz našeg istraživanja, te je bilo moguće uporediti podatke samo za ovaj lokus. U uzorku od 90 muških i 93 ženske osobe, na pomenutom lokusu, pronađeno je 9 različitih alela i to 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 i 16. Najučestaliji je alel 13, sa frekvencijom od 27,9%. U našem istraživanju identifikovano je takođe 9 alela, nije utvrđen alel 16, ali jeste alel 17. Najučestaliji alel takođe je alel 13, sa frekvencijom 32,44%.

Na teritoriji Bosne i Hercegovine vršeno je ispitivanje 14 X-STR markera, u uzorku od 86 muških i 68 ženskih osoba.¹⁵² Od pomenutih 14 lokusa, 4 se poklapaju sa našim istraživanjem, a to su DXS8378, DXS7132, HPRTB i DXS7423. Na lokusu DXS8378, u obe populacije, pronađeno je po 5 istih alela, pri čemu su aleli 10 i 11 najučestaliji. Na lokusu DXS7132, u obe populacije, pronađeno je po 7 istih alela, pri čemu je najučestaliji alel 14, a sledi ga alel 13. Na lokusu HPRTB, u populaciji Bosne i Hercegovine pronađeno je 10, a u populaciji Vojvodine 9 alela, pri čemu je, u obe populacije, najučestaliji alel 13, a sledi ga alel 12. Na lokusu DXS7423, u obe populacije, pronađeno je po 5 istih alela, pri čemu je najučestaliji alel 15, a zatim 14.

Izvršeno je poređenje lokusa populacije Bosne i Hercegovine sa lokusima populacije Vojvodine, pomoću *exact* testa, i ustanovljeno da ne postoji statistički značajna razlika u frekvenciji alela. Izračunate F_{st} vrednosti iznosile su 0,001, identično kao i kod poređenja populacije Hrvatske i Vojvodine.

Uzimajući u obzir samo 4 podudarajuća lokusa, heterozigotnost se kretala između 70,59 - 77,94%, moć diskriminacije za ženske osobe 85,41 - 90,10%, za muške osobe 69,77 - 75,24% i stepen polimorfizma 0,64 - 0,71. Vrednosti izračunatih statističkih parametara su očigledno niže u odnosu na vrednosti prethodno iznetih populacija Vojvodine i Hrvatske, međutim, mora se imati u vidu, da nekoliko najinformativnijih markera nisu uzeti u obzir, jer nisu obuhvaćeni ovim istraživanjem. Kao najmanje informativan pokazao se marker DXS7423, što odgovara podacima populacije Hrvatske, ali se razlikuje od podataka populacije Vojvodine.

Poređenje rezultata populacionih studija, izvršenih u našoj zemlji i zemljama najbližeg okruženja, Hrvatske i Bosne i Hercegovine, ukazuje na veliku sličnost kako u broju, tako i u rasporedu alela po lokusima. Zanimljiva razlika primećena je na lokusu HPRTB, gde je u populaciji Hrvatske i Bosne i Hercegovine utvrđeno prisustvo alela 7 i 16, koji nisu prisutni u populaciji Vojvodine, a s druge strane, u populaciji Vojvodine utvrđeno je prisustvo alela 17, kojeg nema u populacijama navedenih susednih zemalja. Na ovaj detalj trebalo bi obratiti pažnju, kada se, u budućim istraživanjima, obuhvati veći broj osoba, tj. kada se poveća ispitivani uzorak populacije.

Istraživanje populacije severne Italije obuhvatalo je analizu 8 X-STR markera, u uzorku od 147 ženskih i 29 muških osoba. Najinformativniji je, kao i u našoj populaciji, lokus DXS10135, dok je najmanje informativan DXS7423, što predstavlja razliku u odnosu na populaciju Vojvodine, gde je najmanju informativnost pokazao lokus DXS8378. Vrednosti statističkih parametara kretale su se za stepen polimorfizma 0,617 - 0,925, za moć diskriminacije za ženske osobe 83,7 - 99,1%, a za muške osobe 67,3 - 93%. Utvrđene su i forme alela koje do tada nisu opisane, kao što je alel 36.2 na lokusu DXS10134 i aleli 14.2 i 17.2 na lokusu DXS10074.¹⁵⁷

Na teritoriji Mađarske, izvršene su tri, takoreći povezane populacione studije. Prva studija obuhvatila je ispitivanje četiri markera, DXS8378, DXS7132, HPRTB i DXS7423, na uzorku od 219 muških i 165 ženskih osoba.¹⁵⁸ Druga studija, na istom uzorku, proširena je na analizu 8 markera dodatkom DXS10135, DXS10074, DXS10101 i DXS10134.¹⁵⁹ Treća studija, u kojoj je učestvovalo 219 muških i 188 ženskih osoba, izvršena je komercijalnim kitom Mentype argus X-12, tako da je dodatno proširena markerima DXS10148, DXS10079, DXS10103 i DXS10146.¹⁵⁰ Genetička udaljenost između populacije Vojvodine i Mađarske, sa vrednošću F_{st} od 0,003, nešto je veća u odnosu na prethodne tri poređene populacije (Bosne i Hercegovine,

Hrvatske i Italije) gde je vrednost F_{st} iznosila 0,001, ali još uvek pripada vrednostima niske genetičke diferencijacije.

Prema rezultatima prve studije, stepen polimorfizma kreće se u rasponu 0,645 - 0,711, heterozigotnost 73,3 - 79,4%, moć diskriminacije za ženske osobe 85,2 - 90,8%, a za muške osobe 69,4 - 73,4 %, MEC po Krugeru 44,0 - 52,8% i MEC po Kišidi 64,5 - 71,1%. Treba imati u vidu da se u ovoj grupi ipak nalaze lokusi sa nešto manjim brojem alela (6-10 u odnosu na 13-19 alela u drugoj i 7-24 alela u trećoj grupi).

U drugoj studiji, stepen polimorfizma kreće se u rasponu 0,8250 - 0,9325, heterozigotnost 84,85 - 92,73%, moć diskriminacije za ženske osobe 95,69 - 99,22%, a za muške osobe 84,36 - 93,62 %, MEC po Krugeru 68,88 - 87,15% i MEC po Kišidi 82,5 - 93,35%. Takođe, pronađeno je nekoliko mikrovarijanti i retkih alela kao što su aleli 17.1, 18.1, 20.1 i 26.1 na lokusu DXS10135, zatim alel 11 na lokusu DXS10074, aleli 26, 34.2 i 35 na lokusu DXS10101 i aleli 35.3, 37.2, 38.2, 39.2 i 41 na lokusu DXS10134.

U trećoj studiji, stepen polimorfizma poseduje vrednosti 0,7102 - 0,8728, heterozigotnost 71,27 - 86,17%, moć diskriminacije za ženske osobe 90,04 - 97,56%, a za muške osobe 74,44 - 88,36 %, MEC po Krugeru 53,19 - 76,73%, MEC po Kišidi 71,02 - 87,27%, MEC po Desmaraisu 71,02 - 87,28% i MEC po Desmaraisu za parove otac/kći i majka/sin 57,27 - 78,44%.

Osim brojnih istraživanja koja su vršena u zemljama našeg kontinenta^{146,160}, slične populacione studije rađene su i širom sveta.^{145,146,151,152,161,162} Ono što je zajedničko i što se navodi u zaključcima svih navedenih objavljenih radova, jeste to, da X-STR markeri ispunjavaju postavljene kriterijume o stepenu polimorfizma, heterozigotnosti, moći diskriminacije i isključivanja, te da je njihova samostalna primena ili primena u vidu dodatne metode, uz analizu drugih markera, u potpunosti opravdana.

Međutim u odnosu na naše podatke, postoje i određene razlike. U populaciji pokrajine Guangdong, na jugu Kine, zatim u populaciji Somalije i Južne Koreje, najmanje informativan je lokus DXS7423 sa vrednošću PIC 0,42%, 0,59% i 0,41% respektivno, dok je kod nas to lokus DXS8378 sa vrednošću PIC 0,64%. Statistički značajne razlike, u odnosu na populaciju Vojvodine, zabeležene su za lokus DXS7423 kod populacija Južne Koreje i Kine, kao i za lokus DXS8378 kod populacije Grenlanda. Ovo upravo potvrđuje teoriju prema kojoj isti markeri nisu podjednako informativni u

različitim populacijama, te je sasvim moguće da u jednoj populaciji određeni marker bude među najmanje informativnim, dok u drugim populacijama bude mnogo informativniji, a samim tim i mnogo značajniji za forenzičku primenu.

Razlike u distribuciji i frekvencijama alela, a time i genetička bliskost, odnosno udaljenost između populacija, prikazana je vrednostima F_{st} , a na osnovu kojih, konstruisani dendrogrami i koordinatni sistemi (Slike 20 do 25), na jednostavan, vizuelan način prikazuju odnose između populacija. Ono što je na prvi pogled najuočljivije, to je da postoji grupisanje evropskih populacija, što ukazuje na njihovu genetičku bliskost. U grupu sa evropskim populacijama spada i populacija kavkaskih Amerikanaca. Nešto genetički izdvojenija od ostalih evropskih populacija jeste populacija Danske, ali istovremeno, ona pokazuje više genetičke bliskosti sa populacijom severnog dela Belorusije u odnosu na ostale evropske populacije. Populaciji Latinoamerikanaca pripada posebna grupa, koja je, opet, bliža evropskim populacijama, u odnosu na populacije Afrike i Azije. Afroamerikanci i dve analizirane populacije Somalije svrstane su u istu grupu na osnovu genetičke bliskosti, a takođe i populacije Kine, Južne Koreje i azijski Amerikanci, s tim što unutar ove grupe, pojedini vizuelni prikazi pokazuju veću bliskost između populacija Koreje i azijske Amerike (PCoA), a drugi između Kine i azijske Amerike (UPGMA). Populacija Grenlanda predstavlja genetički najudaljeniju populaciju od svih analiziranih i svrstana je u posebnu grupu. Najveća genetička diferencijacija, u ovom istraživanju, upravo je i zabeležena između populacije Grenlanda i Afroamerikanaca, a F_{st} vrednost iznosila je 0,062. Prezentovana poređenja između populacija u skladu su sa rezultatima drugih istraživanja¹⁵⁴, gde je takođe najveću genetičku diferencijaciju pokazala populacija Grenlanda, u odnosu na 13 ispitivanih populacija.

Kao što je ranije pomenuto, u slučaju da su određeni lokusi međusobno povezani, odnosno da se nalaze u *linkage disequilibrium-u*, preporučuje se analiza frekvencije haplotipova X-STR markera, umesto frekvencije alela. Jedna od najobimnijih studija o haplotipovima napravljena je u Nemačkoj, izvršena je pomoću komercijalnog kita *Mentype Argus X-12*, a obuhvatila je 1037 učesnika muškog pola.¹⁶³ U prvoj grupi pronađeno je 504 različita haplotipa, u drugoj grupi 278, u trećoj grupi 248 i u četvrtoj grupi 389. Najčešći haplotip predstavlja 19-12-30.2, kombinacije lokusa DXS10103-HPRTB-DXS10101. Zabeležen je 37 puta, odnosno ima frekvenciju od

3,57%. Ovo istraživanje ujedno je dalo i prve podatke o haplotipskim frekvencijama u populaciji Nemačke.

U uzorku populacije Vojvodine, sačinjenom od 175 muških osoba, pronađeno je 140 haplotipova u prvoj grupi, 112 haplotipova u drugoj grupi, 118 haplotipova u trećoj grupi i 124 haplotipa u četvrtoj grupi, što ukupno predstavlja 494 različita haplotipa. Najučestaliji haplotip je 14-20-8, pripada kombinaciji lokusa II grupe (DXS7132-DXS10079-DXS10074) i pronađen je 7 puta u ispitivanom uzorku populacije, odnosno ima učestalost od 4%. U samo jednoj kopiji, nađeno je ukupno 369 haplotipova.

U populaciji Italije¹⁴⁸ zabeleženo je 156, 115, 114 i 142 haplotipa po grupama, respektivno. Najučestaliji haplotip je 19-31.2-12, a pripada kombinaciji lokusa DXS10103-DXS10101-HPRTB. Zabeležen je 10 puta, odnosno pojavljuje se kod 5% osoba ove populacije.

U populaciji Egipta¹⁶⁴ raspored haplotipova po grupama bio je 217, 137, 129 i 185, pri čemu najčešći haplotip 19-29.2-12 pripada kombinaciji lokusa DXS10103-HPRTB-DXS10101, a zabeležen je 9 puta, odnosno prisutan je u frekvenciji od 3,6%.

Za razliku od rezultata naše populacije, gde je najučestaliji haplotip pronađen u II grupi, u navedene tri studije (Nemačke, Italije i Egipta) najučestaliji haplotip nalazio se u III grupi.

Poput drugih izrađenih populacionih studija u kojima su analizirani haplotipovi X-str markera^{148,164,165,166} i u istraživanju populacije Vojvodine, I grupa bila je najpolimorfija, dok su II i III grupa bile najmanje polimorfne.

Iako je nezahvalno prognozirati kako će se u budućnosti kretati istraživanja u forenzičkoj genetici, određena predviđanja idu u pravcu sve manjeg ulaganja finansijskih sredstava, kao i smanjenju vremena neophodnog za dalja istraživanja. Povećano ineteresovanje, javiće se za statističke metode, kojima će se analizirati velika količina podataka, dobijena iz sve brojnijih, novoistraženih markera. Ovakva predviđanja proizilaze iz praktičnih slučajeva, pre svega iz oblasti utvrđivanja spornih srodničkih odnosa, a zatim i iz oblasti kriminalistike, koji se, u današnje vreme, rešavaju sa zadovoljavajućim stepenom verovatnoće, te se priliv materijalnih sredstava neće zadržati na dosadašnjem nivou. Retke situacije prilikom utvrđivanja srodstva, za sada još uvek rešene na nezadovoljavajućem nivou, jesu razlikovanja "pravih" braće i sestara od polubraće/polusestara, kao i polubraće/polusestara od nesrodnih osoba.¹⁶⁷ Međutim, rešavanje ovih najkompleksnijih problema vršiće se istovremenom analizom većeg

broja različitih, ali već postojećih markera, na kraju čega će, krajnji ishod, opet najviše zavisiti od primene odgovarajućih statističkih metoda, neohodnih za pravilnu ocenu vrednosti dobijenih DNK profila.¹⁶⁸

8. ZAKLJUČAK

U radu je proučavana varijabilnost mikrosatelitskih lokusa X hromozoma u populaciji Vojvodine. Na osnovu sprovedenog istraživanja potvrđena je postavljena hipoteza i izvedeni su sledeći zaključci:

1. Izrađena je prva populaciona studija mikrosatelitskih markera X hromozoma u našoj zemlji, iz koje je moguće odrediti broj i frekvenciju alela na svakom od 12 ispitivanih lokusa, kao i strukturu i frekvenciju haplotipova u populaciji Vojvodine.
2. Broj alela na ispitivanim lokusima kreće se između 5 i 20. Locus sa najvećim brojem alela je DXS10146, a dva lokusa sa najmanjim brojem alela su DXS8378 i DXS7423.
3. Poređenjem sa populacionim podacima iz studija Hrvatske i Bosne i Hercegovine, uočava se sličnost u rasporedu i frekvencijama alela po lokusima, pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika između ovih populacija i populacije Vojvodine.
4. Statistički značajna razlika zabeležena je za lokus DXS7423 kod populacija Južne Koreje i Kine, kao i za lokus DXS8378 kod populacije Grenlanda, u odnosu na populaciju Vojvodine.
5. Poređenje populacija, na osnovu izračunatih F_{st} vrednosti, ukazuje na nisku genetičku diferencijaciju između populacije Vojvodine i drugih evropskih populacija, kao i populacije kavkaskih Amerikanaca, i srednju genetičku diferencijaciju u odnosu na upoređivane populacije Amerike, Afrike i Azije.
6. Najveću genetičku udaljenost, kako od populacije Vojvodine, tako i od drugih populacija koje su obuhvaćene analizom, pokazala je populacija Grenlanda.
7. Za ispitivane lokuse, stepen polimorfizma kreće se u rasponu od 0,6463 do 0,9108. Najveći stepen polimorfizma pokazao je lokus DXS10135, dok je najmanje informativan lokus DXS8378.

8. Heterozigotnost ispitivanih lokusa kreće se u rasponu od 70,16 do 91,67%. Najveći stepen heterozigotnosti poseduje lokus DXS10135, a najmanji lokus DXS8378.
9. Moć isključivanja ispitivanih lokusa kreće se u rasponu od 43,07 do 82,97%. Najveću vrednost poseduje lokus DXS10135, a najmanju lokus DXS8378.
10. Moć diskriminacije za ženske osobe kreće se u rasponu od 85,57 do 98,71%, a za muške osobe od 70,16 do 91,67%. Najveću vrednost poseduje lokus DXS10135, a najmanju lokus DXS8378.
11. Prosečna šansa isključivanja:
 - u situaciji kada je potrebno analizirati uzorke majke, deteta i majke pretpostavljenog oca - otac nedostaje (formula po Krugeru), kreće se između 44,45 - 83,17%.
 - u situaciji kada je potrebno analizirati uzorke majke, ženskog deteta i pretpostavljenog oca (formula po Kishidi), kreće se između 64,63 - 91,07%.
 - u situaciji kada je potrebno analizirati uzorke majke, ženskog deteta i pretpostavljenog oca (formula po Desmaraisu), kreće se između 64,63 - 91,08%.
 - u situaciji kada je potrebno analizirati uzorke majke i sina, odnosno oca i ćerke (formula po Desmaraisu), kreće se između 50,19 - 84,2%.
12. Analizom 12 X-STR lokusa, u uzorku od 175 muških osoba, utvrđeno je 494 različita haplotipa (po grupama 140, 112, 118 i 124). Najučestaliji haplotip prisutan je u 4% ispitivane populacije, a 369 haplotipova zabeleženo je samo po jednom (po grupama 113, 73, 81 i 102).
13. Dobijeni rezultati analize haplotipova pokazuju da je I grupa najpolimorfnije, dok su II i III grupa najmanje polimorfne, što je u skladu sa rezultatima studija u populacijama Italije, Egipta i Somalije.
14. Na osnovu svih dobijenih rezultata zaključuje se da se analiza ispitivanih X-STR markera može uspešno primeniti u slučajevima iz oblasti medicinske

kriminalistike, humane identifikacije i veštačenja spornih srodničkih odnosa, u populaciji Vojvodine.

15. Rezultati sprovedene populacione studije mogu poslužiti kao osnova i baza podataka za dalja istraživanja u populaciono-genetičkim, antropološkim, demografskim i drugim oblastima.

9. LITERATURA

1. Walsh SJ. Current and future trends in forensic molecular biology. In: Molecular Forensics, Rapley R, Whitehouse D Editors. Wiley 2007.
2. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. "A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms". Nature 2001; 409(6822): 928-933.
3. Zhivotovsky LA, Bennett L, Bowcock AM, Feldman MW. Human Population Expansion and Microsatellite Variation. Mol Biol Evol 2000; 17(5): 757-767.
4. Szibor R. X-chromosomal markers: Past, present and future. Forensic Sci Int Genet 2007; 1: 93-99.
5. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson: Genetics in Medicine. Elsevier; 2007.
6. Savić -Pavićević D. Matić G. Molekularna biologija 1. NNK international, Beograd. 2011.
7. Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics, 4rd Edition, Garland Science, USA; 2011.
8. http://vega.sanger.ac.uk/Homo_sapiens/index.html
9. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson: Genetics in Medicine. Saunders Elsevier, 2007.
10. Turnpenny P. Ellard S. Emery's Elements of Medical Genetics, 12th ed. Elsevier, London; 2005.
11. http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Gene_Structure2-Family_of_Genes.html
12. Mighell AJ, Smith NR, Robinson PA, Markham AF. Vertebrate pseudogenes. FEBS Lett 2000; 468: 109-114.
13. Pink RC, Wicks K, Caley DP, Punch EK, Jacobs L, Raul D, et al. Pseudogenes: Pseudo-functional or key regulators in health and disease? RNA 2011; 17(5): 792-798.
14. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001; 409: 860-921.

15. Iben JR, Maraia RJ. tRNA gene copy number variation in humans. *Gene* 2014; 536(2): 376-84.
16. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23(20): 4051-4060.
17. Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67(4): 657-685.
18. Richard GF, Kerrest A, Dujon B. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008; 72: 686-727.
19. Okada T, Gondo Y, Goto J, Kanazawa I, Hadano S, Ikeda JE. Unstable transmission of the RS447 human megasatellite tandem repetitive sequence that contains the USP17 deubiquitinating enzyme gene. *Hum Genet* 2002; 110(4): 302-13.
20. Szibor R, Krawczak M, Hering S, Edelmann J, Kuhlisch E, Krause D. Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int J Legal Med* 2003; 117(2): 67-74.
21. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 435-445.
22. Hancock JM, Simon M. "Simple sequence repeats in proteins and their significance for network evolution". *Gene* 2005; 345(1): 113-118.
23. Babushkina NP, Kucher AN. Functional role of VNTR polymorphism of human genes. *Russian Journal of Genetics* 2011; 47(6): 637-645.
24. Kashi Y, King D, Soller M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Genet* 1997; 13: 74-78.
25. Rockman MV, Wray GA. "Abundant raw material for cis-regulatory evolution in humans". *Mol Biol Evol* 2002; 19(11): 1991-2004.
26. Bidichandani SI, Ashizawa T, Patel PI. The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 111-121.
27. Akagi T, Yin D, Kawamata N, Bartram CR, Hofmann WK, Song JH, et al. Functional analysis of a novel DNA polymorphism of a tandem repeated sequence in the asparagine synthetase gene in acute lymphoblastic leukemia cells. *Leuk Res* 2009; 33(7): 991-996.

28. Jemaa R, Ben Ali S, Kallel A, Feki M, Elasmı M, Taieb SH, et al. Association of a 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with hypertension in a Tunisian population. *Clin Biochem* 2008; 42: 852-856.
29. Pearson CP, Edamura KN, Cleary JD. "Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations". *Nat Rev Genet* 2005; 6(10): 729-742.
30. Brinkmann B. Overview of PCR-based systems in identity testing. *Methods Mol Biol* 1998; 98: 105-119.
31. Lai Y, Sun F. The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Mol Biol Evol* 2003; 20: 2123-2131.
32. Bhargava A, Fuentes FF. Mutational dynamics of microsatellites. *Mol Biotechnol* 2009; 44: 250-266.
33. Koole W, Schafer HS, Agami R, Haaften G, Tijsterman M. A versatile microsatellite instability reporter system in human cells. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(16): e158.
34. Kruglyak S, Durrett RT; Schug MD, Aquadro CF. Equilibrium distributions of microstellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10774-10778.
35. Pumpernik D, Oblak B, Borstnik B. Replication slippage versus point mutation rates in short tandem repeats of the human genome. *Mol Genet Genomics* 2008; 279: 53-61.
36. Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo A. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 2002; 11: 2453-2465.
37. http://www.ensemble.org/homo_sapiens/Location/Genome
38. Lamb JC, Birchler JA. The role of DNA sequence in centromere formation. *Genome Biology* 2003; 4(5): 214-218.
39. Morris CA, Moazed D. Centromere Assembly and Propagation. *Cell* 2007;128: 647-650.
40. Mehta GD, Agarwal MP, Ghosh SK. Centromere identity: a challenge to be faced. *Mol Genet Genomics* 2010; 284: 75-94.

41. Glynn M, Kaczmarczyk A, Prendergast L, Quinn N, Sullivan KF. Centromeres: assembling and propagating epigenetic function. *Subcell Biochem* 2010; 50: 223-249.
42. Aldrup-MacDonald ME, Sullivan BA. The Past, Present, and Future of Human Centromere Genomics. *Genes* 2014; 5(1): 33-50.
43. Graves JA. Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell* 2006; 125: 901-914.
44. http://vega.sanger.ac.uk/Homo_sapiens/index.html
45. Mungall AJ, Palmer SA, Sims SK, Edwards CA, Ashurst JL, Wilming L, et al. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature* 2003; 425: 805-811.
46. Humphray SJ, Oliver K, Hunt AR, Plumb RW, Loveland JE, Howe KL, et al. DNA sequence and analysis of human chromosome 9. *Nature* 2004; 429: 369-374.
47. Deloukas P, Earthworn ME, Grafham DV, Rubinfeld M, French L, Steward CA, et al. The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 10. *Nature* 2004; 429: 375-381.
48. Dunham A, Matthews LH, Burton J, Ashurst JL, Howe KL, Ashcroft KJ, et al. The DNA sequence and analysis of human chromosome 13. *Nature* 2004; 428: 522-528.
49. Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, et al. The DNA sequence of human X chromosome. *Nature* 2005; 434: 325-337.
50. Lewis R. *Human Genetics: Concepts and Applications*. McGraw - Hill; 2005
51. Stanley MG, Goldman MA. X-Chromosome Inactivation. *Encyclopedia of life Sci/ 2001 Nature Publishing Group/ www.els.net*.
52. Mangs HA, Morris BJ. The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. *Curr Genomics* 2007; 8(2): 129-136.
53. Veerappa AM, Padakannaya P, Ramachandra NB. Copy number variation-based polymorphism in a new pseudoautosomal region 3 (PAR3) of a human X-chromosome-transposed region (XTR) in the Y chromosome. *Functional Integrative Genomics* 2013; 13(3): 285-293.
54. Mann JD, Cahan A, Gelb AG, Fisher N, Hamper J, Tippett P, et al. A sex-linked blood group. *Lancet* 1962; 1: 8-10.

55. Sanger R, Tippett P, Gavin J. Xg groups and sex abnormalities in people of northern European ancestry. *J Med Genet* 1971; 8: 417-426.
56. Sanger R, Tippett P, Gavin J, Teesdale P, Daniels GL. Xg groups and sex chromosome abnormalities in people of northern European ancestry: an addendum. *J Med Genet* 1977; 14: 210-211.
57. Tippett P, Ellis NA. The Xg blood group system: a review. *Transfus Med Rev* 1998; 12: 233-257.
58. Lewis FJW, Froland A, Sanger R, Race RR. Source of the X chromosomes in two XXXXY males. *Lancet* 1964;2:589.
59. Adam A, Tippett P, Gavin J, Noades J, Sanger R, Race RR. The linkage relation of Xg to G-6-pd in Israelis: the evidence of a second series of families. *Ann Hum Genet* 1967; 30: 211-218.
60. Yoshida A, Giblett ER, Malcolm LA. Heterogeneous distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants with enzyme deficiency in the Markham Valley Area of New Guinea. *Ann Hum Genet* 1973; 37: 145-150.
61. Askov M, Kutlar A, Kutlar F, Dinçol G, Erdem S, Bastesbihci S. Survey on haemoglobin variants, beta thalassaemia, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and haptoglobin types in Turks from western Thrace. *J Med Genet* 1985; 22: 288-290.
62. Roychoudhury AK, Nei M. *Human Polymorphic Genes: World Distribution*, Oxford University Press, New York. 1988.
63. Chen SH, Malcolm LA, Yoshida A, Giblett ER. Phosphoglycerate kinase: an X-linked polymorphism in man. *Am J Hum Genet* 1971; 23: 87-91.
64. Oberle I, Camerino G, Heilig R, Grunebaum L, Cazenave JP, Crapanzano C, et al. Genetic screening for hemophilia A (classic hemophilia) with a polymorphic DNA probe. *N Engl J Med* 1985; 312: 682-686.
65. Lalloz MR, McVey JH, Pattinson JK, Tuddenham EG. Haemophilia A diagnosis by analysis of a hypervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene. *Lancet* 1991; 338: 207-211.
66. Lalloz MR, Schwaab R, McVey JH, Michaelides K, Tuddenham EG. Haemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two variable dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene. *Br J Haematol* 1994; 86: 804-809.

67. Lambropoulos AF, Frangoulides E, Kotsis A, Dozi-Vassiliades I. Rapid typing of 4 VNTR loci, 3'ApoB, MCT118, St14 and YNZ22 by the polymerase chain reaction of a Greek sample. *Cell Mol Biol* 1995; 41: 699-702.
68. Yun WM, Yun SG. Analysis of the VNTR locus DXS52 by the Amp-FLP technique. *J Forensic Sci* 1996; 41: 859-861.
69. Hearne CM, Todd JA. Tetranucleotide repeat polymorphism at the HPRT locus. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 5450-5450.
70. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 1992; 12: 241-253.
71. Kishida T, Tamaki Y. Japanese population data on X-chromosomal STR locus AR. *Nippon Hoigaku Zasshi* 1997; 51: 376-379.
72. Xiao FX, Gilissen A, Cassiman JJ, Decorte R. Quadruplex fluorescent STR typing system (HUMVWA, HUMTHOI, D21S11 and HPRT) with sequence-defined allelic ladders identification of a new allele at D21S11. *Forensic Sci Int* 1998; 94: 39-46.
73. Szibor R, Lautsch S, Plate L, Beck N. Population data on the X chromosome short tandem repeat locus HumHPRTB in two regions of Germany. *J Forensic Sci* 2000; 45: 231-233.
74. Sleddens HF, Oostra BA, Brinkmann AO, Trapman J. Trinucleotide repeat polymorphism in the androgen receptor gene (AR). *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 1427-1427.
75. Kishida T, Wang W, Fukuda M, Tamaki Y. Duplex PCR of the Y-27H39 and HPRT loci with reference to Japanese population data on the HPRT locus. *Nippon Hoigaku Zasshi* 1997; 51: 67-69.
76. Desmarais D, Zhong Y, Chakraborty R, Perreault C, Busque L. Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA). *J Forensic Sci* 1998; 43: 1046-1049
77. Kruger J, Fuhrmann W, Lichte KH, Steffens C. On the utilization of erythrocyte acid phosphatase polymorphism in paternity evaluation. *Dtsch Z Gerichtl Med* 1968; 64: 127-146.

78. Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P. Variation in short tandem repeat sequences - a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int J Legal Med* 1994; 107: 13-20.
79. de Knijff M, Kayser A, Caglia D, Corach N, Fretwell C, Gehrig G, et al. Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects. *Int J Legal Med* 1997; 110(3): 134-149.
80. Kayser M, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, et al. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *Int J Legal Med* 1997a; 110(3): 125-133.
81. Kayser M, de Knijff P, Dieltjes P, et al. () Applications of microsatellite-based Y chromosome haplotyping. *Electrophoresis* 1997b; 18: 1602-1607.
82. Roewer L, Krawczak M, Willuweit S, Nagy M, Alves C, Amorim A, et al. Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes. *Forensic Sci Int* 2001; 118: 106-113.
83. Joblig MA, Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Rev Genet* 2004; 5: 739-751
84. Wright S. The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 1951; 15(4): 323-354.
85. Carracedo A, Butler JM, Gusmao L, Linacre A, Parson W, Roewer L et al. New guidelines for the publication of genetic population data. *Forensic Sci Int Genet* 2013; 7: 217-220.
86. Balding DJ, Nichols RA. A method for quantifying differentiation between populations at multi-allelic loci and its implications for investigating identity and paternity. *Genetica (Springer)* 1995; 96: 3-12.
87. Bar W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, et al. DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Int J Legal Med* 1997; 110: 175-176.
88. La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991; 352: 77-79.
89. Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation,

- impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3777-3782.
90. Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A, et al. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3320-3323.
 91. <http://www.chrx-str.org>
 92. Zarrabeitia MT, Alonso A, Martin J, Gonzalez-Gay MA, Martin-Escudero JC, Martinez de Pancorbo M, et al. Study of six X-linked tetranucleotide microsatellites: population data from five Spanish regions. *Int J Legal Med* 2006; 120: 147-150.
 93. Shin KJ, Kwon BK, Lee SS, Yoo JE, Park MJ, Chung U, et al. Five highly informative X chromosomal STRs in Koreans. *Int J Legal Med* 2004; 118: 37-40.
 94. Shin SH, Yu JS, Park SW, Min GS, Chung KW. Genetic analysis of 18 X-linked short tandem repeat markers in Korean population. *Forensic Sci Int* 2005; 147: 35-41.
 95. Tabbada KA, De Ungria MC, Faustino LP, Athanasiadou D, Stradmann-Bellinghausen B, Schneider PM. Development of a pentaplex X-chromosomal short tandem repeat typing system and population genetic studies. *Forensic Sci Int* 2005; 154(2-3): 173-80.
 96. Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, et al. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* 2001; 411: 199-204.
 97. Jorde LB, Bamshad M, Rogers AR. Using mitochondrial and nuclear DNA markers to reconstruct human evolution. *Bioessays* 1998; 20: 126-136.
 98. Edelmann J, Hering S, Kuhlisch E, Szibor R. Validation of the STR DXS7424 and the linkage situation on the X-chromosome. *Forensic Sci Int* 2002; 125: 217-222.
 99. Kaessmann H, Zöllner S, Gustafsson AC, Wiebe V, Laan M, Lundeberg J, et al. Extensive Linkage Disequilibrium in Small Human Populations in Eurasia. *Am J Hum Genet* 2002; 70(3): 673-685.
 100. Marinković D, Tucić N, Kekić V. *Genetika. Naučna knjiga, Beograd; 1991.*

101. Hammond HA, Jin L, Zhong Y, Caskey CT, Chakraborty R. Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification application. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 175-189.
102. Polymeropoulos MH, Xiao H, Rath DS, Merrill CR. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human tyrosine hydroxylase gene (TH). *Nucleic Acids Res* 1991; 19(13): 3753 -3753.
103. Anker R, Steinbrueck T, Donis-Keller H. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase (hTPO) locus. *Hum Mol Genet* 1992;1: 137-137.
104. Millis KA, Even D, Murray JC. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human alpha fibrinogen locus. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 779- 779.
105. Gill P, Woodroffe S, Bar W, Brinkmann B, Carracedo A, Eriksen B, et al. A report of a international collaborative experiment to demonstrate the uniformity obtainable using DNA profiling techniques. *Forensic Sci Int* 1992; 53: 29-43.
106. Carracedo A, Laureu MV. Development of New STRs for Forensic Casework: Criteria for Selection, Sequencing & Population Data and Forensic Validation. Ninth International Symposium on Human Identification 1988: Promega Corporation, Madison WI.
107. Li H, Cui X, Arnheim N. Direct electrophoretic detection of the allelic state of single DNA molecules in human sperm by using the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(12): 4580-4584.
108. Veselinović I. Distribucija alela mikrosatelitskih lokusa dezoksiribonukleinske kiseline u populaciji Vojvodine. Magistarski rad, Medicinski fakultet Novi Sad 2004.
109. Budowle B, Koons BW, Errera JD. Multiplex amplification and typing procedure for the loci DIS80 and amelogenin. *J Forensic Sci* 1996; 41: 660-663.
110. Isenberg AR, McCord BR, Koons BW, Budowle B, Allen RO. DNA typing of a polymerase chain reaction DIS80/amelogenin multiplex using capillary electrophoresis and a mixed entangled polymer matrix. *Electrophoresis* 1996; 7: 1505-1511.
111. Veselinović I. Varijabilnost Y mikrosatelitskih lokusa deosiribonukleinske kiseline u populaciji Vojvodine. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet Novi Sad 2007.

112. Brkić H, Kubat M, Strinović D, Šlaus M. Osnove medicinske kriminalistike. U: Zečević D. Editor. Sudska medicina i deontologija. Medicinska naklada Zagreb, 2004.
113. Zgonjanin D. Forenzička analiza sekvenci humane mitohondrijalne DNA kapilarnom elektroforezom. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad 2010.
114. Castella V, Dimo-Simonin, Brandt-Casadevall C, Mangin PI. Forensic evaluation of the QIAshredder/QIAamp DNA extraction procedure. *Forensic Sci Int* 2006; 156: 70-73.
115. Greenspoon SA, Ban JD, Sykes K, Ballard EJ, Edler SS, Baisden M, et al. Application of the BioMek (R) 2000 laboratory automation workstation and the DNAIQ (TM) system to the extraction of forensic casework samples. *J Forensic Sci* 2004; 49: 29-39.
116. Montpetit SA, Fitch IT, O'Donnell PT. A simple automated instrument for DNA extraction in forensic casework. *J Forensic Sci* 2005; 50: 555-563.
117. Moss D, Harbison SA, Saul DJ. An easily automated, closed - tube forensic DNA extraction procedure using a thermostable proteinase. *Int J Legal Med* 2003; 117: 340-349.
118. Vanderberg N, Oorschot RAH. Extraction of human nuclear DNA from feces samples using the QIAamp DNA stool mini kit. *J Forensic Sci* 2002; 47: 993-995.
119. Klintchar M, Neuhuber F. Evaluation of a an alkaline lysis method for the extraction of DNA from whole blood and forensic stains for STR analysis. *J Forensic Sci* 2000; 45: 669-673.
120. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 1988; 10: 1215-1215.
121. Sambrook J, Fitch EF, Maniatis T. In: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York; 1989.
122. Walsh BS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR - based typing from forensic material. *BioTechniques* 1991; 10: 506-513.
123. McHale R, Stapleton PM, Bergquist PI. A rapid method for the preparation of samples for PCR. *Biotechniques* 1991; 10: 20-22.

124. Akane A Matsubara K, Nakamura Takahashi S, Kimura K. Identification of the heme compound co-purified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains. A major inhibitor of the polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J Forensic Sci* 1994; 30: 362- 372.
125. Klintschar M, Neuhuber F. Evaluation of an alkaline lysis method for the extraction of DNA from whole blood and forensic stains for STR analysis. *J Forensic Sci* 2000; 45(3): 669-673.
126. Starnbach MN, Falkow S, Tomkins LS. Species - specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridisation. *J Klin Microbiol* 1989; 27: 1257-1261.
127. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 3741-3751.
128. Moreira D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose - embedded DNA preparations. *Nucl Acids Res* 1998; 26: 3309-3310.
129. *Instruction manual, Chelex[®] 100, Bio-rad laboratories, Hercules, CA*
130. Singer-Sam J, Tasnguy R. Use of chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications* 1989; 3: 134-139.
131. Saiki RK, Mullis HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA- polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
132. Lins AM, Sprecher CJ, Puers C, Schumm JW. Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci - silver stain and fluorescence detection. *BioTechniques* 1996; 20: 882- 889.
133. Sprecher CJ, Puers C, Lins AM, Schumm JW. General approach to analysis of polymorphic short tandem repeat loci. *BioTechniques* 1996; 20: 266-276.
134. Buel E. Schwartz M, LaFountain MJ. Capillary electrophoresis STR analysis; comparison to gel- based systems. *J Forensic Sci* 1998; 43:164-170.
135. Butler JM. Application of dual internal standards for precise sizing of polymerase chain- reaction products using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 1995; 16: 974-980.
136. Heiger DN, Cohen AS, Karger BL. Separation of DNA restriction fragments by high-performance capillary electrophoresis in low and zero cross-linked polyacrylamide using continuous and pulsed electric fields. *J Chromatography* 1990; 516: 33-48.

137. Butler JM, Buel E, Crivellente F, McCord BR. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analysers for STR analysis. *Electrophoresis* 2004; 25(10-11): 1397-1412.
138. Botstein D, White RI, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1980; 32: 314-331.
139. Nei M, Roychoudhury AK. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 1974; 76: 379-390.
140. Takezaki N, Nei M, Tamura K. POPTREE2: Software for Constructing Population Trees from Allele Frequency Data and Computing Other Population Statistics with Windows Interface. *Mol Biol Evol* 2010; 27(4): 747-752.
141. Latter BDH. Selection in finite populations with multiple alleles. III. Genetic divergence with centripetal selection and mutation. *Genetics* 1972; 70: 475-490.
142. Wright S. *Evolution and the Genetics of Population, Variability Within and Among Natural Populations*. The University of Chicago, Chicago Press, 1978.
143. Peakall R, Smouse PE. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 2012; 28: 2537-2539.
144. Gršković B, Zidkova A, Stenzl V, Popović M, PrimoracD, Mršić G. Analysis of 8 X-chromosomal markers in the population of central Croatia. *Croat Med J* 2013; 54(3): 238-247.
145. Lim EJ, Lee HY, Sim JE, Yang WI, Shi KJ. Genetic Polymorphism and Haplotype Analysis of 4 Tightly Linked X-STR Duos in Koreans. *Croat Med J* 2009; 50: 305-312.
146. Hedman M, Palo JU, Sajantila A. X-STR diversity patterns in the Finnish and the Somali population. *Forensic Sci Int Genet* 2009; 3(3): 173-178.
147. Becker D, Rodig H, Augustin C, Edelmann J, Götz F, Hering S, et al. Population genetic evaluation of eight X-chromosomal short tandem repeat loci using Mentype Argus X-8 PCR amplification kit. *Forensic Sci Int Genet* 2008 Jan; 2(1): 69-74.
148. Bini C, Riccardi LN, Ceccardi S, Carano F, Sarno S, Luiselli D, et al. Expanding X-chromosomal forensic haplotype frequencies database: Italian population data of four linkage groups. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 15: 127-130.

149. Rebała K, Kotova SA, Rybakova VI, Zabauskaya TV, Shyla AA, Spivak AA, et al. Variation of X-chromosomal microsatellites in Belarus within the context of their genetic diversity in Europe. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 16: 105-111.
150. Horvath G, Zalan A, Kis Z, Pamjav H. A genetic study of 12 STR loci in the Hungarian population. *Forensic Sci Int Genet* 2012; 6: e46-47.
151. Zeng XP, Ren Z, Chen JD, Lu DJ, Tong DY, Chen H, Sun HJ. A genetics polymorphism of twelve X-chromosomal STR loci in Chinese Han population from Guangdong Province. *Forensic Sci Int Genet* 2011; 3: e365-366.
152. Diegoli TM, Kovačević L, Pojskić N, Coble M, Marjanović D. Population study of fourteen X chromosomal short tandem repeat loci in a population from Bosnia and Herzegovina. *Forensic Sci Int Genet* 2011; 5(4): 350-351.
153. Zidkova A, Capek P, Horinek A, Coufalova P. Investigator® Argus X-12 study on the population of Czech Republic: comparison of linked and unlinked X-STRs for kinship analysis. *Electrophoresis* 2014; 35(14): 1989-1992.
154. Tomas C, Pereira V, Morling N. Analysis of 12 X-STRs in Greenlanders, Danes and Somalis using Argus X-12. *Int J Legal Med* 2012; 126: 121-128.
155. Tomas C, Skitsa I, Steinmeier E, Poulsen L, Ampati A, Borsting C, et al. Results for five sets of forensic genetic markers studied in a Greek population sample. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 16: 132-137.
156. Crkvenac-Gornik K, Grubić Z, Štingl K, Tonković- Đurišević I, Begović D. Application of microsatellite loci on the chromosome X for rapid prenatal detection of the chromosome X numerical abnormalities. *Croat Med J* 2011; 52(3): 392-395.
157. Turrina S, Filippini G, De Leo D. Genetic studies of eight X-STRs in a Northeast Italian population. *Forensic Sci Int Genet Suppl Series* 2009; 2: 396-397.
158. Zalan A, Volgyi A, Jung M, Peterman O, Pamjav H. Hungarian population data of four X-linked markers: DXS8378, DXS7132, HPRTB, and DXS7423 *Int J Legal Med* 2007; 121(1):74-77.
159. Zalan A, Volgyi A, Brabetz W, Schleinitz D, Pamjav H. Hungarian population data of eight X-linked markers in four linkage groups. *Forensic Sci Int* 2008; 175: 73-78.

160. Pepinski W, Skawronska M, Niemcunowicz-Janica A, Koc-Zorawska E, Janica J, Soltyszewski I. Polymorphism of four Xchromosomal STRs in a Polish population sample. *Forensic Sci Int* 2005; 151(1): 93-95.
161. Poetsch M, Knop A, El-Mostaqim D, Rakotomavo N, von Wurmb-Schwark N. Allele frequencies of 11 X-chromosomal loci of two population samples from Africa. *Int J Legal Med* 2011; 125(2): 307-314.
162. Gomes I, Amorim A, Pereira V, Carracedo A, Gusmao L. Genetic patterns of 10 X chromosome short tandem repeats in an Asian population from Macau *Forensic Sci Int Genet Suppl Series* 2009; 2: 402-404.
163. Edelmann J, Lutz-Bonengel S, Naue J, Hering S. X-chromosomal haplotype frequencies of four linkage groups using the Investigator Argus X-12 Kit. *Forensic Sci Int Genet* 2012; 6: 24-34.
164. Elakkary S, Hoffmeister-Ullerich S, Schulze C, Seif E, Sheta A, Hering S, et al. Genetic polymorphisms of twelve X-STRs of the investigator Argus X-12 kit and additional six X-STR centromere region loci in an Egyptian population sample. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 11: 26-30.
165. Costa AH, Morais P, Vieira da Silva C, Matos S, Marques Santos R, Espinheira R, et al. X-chromosome STR markers data in a Cabo Verde immigrant population of Lisboa. *Mol Biol Rep* 2014; 41(4): 2559-2569.
166. Kling D, Dell'Amico B, Haddeland PJT, Tillmar AO. Population genetic analysis of 12 X-STRs in a Somali population sample. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 11: e7–e8.
167. Nothnagel M, Schmidtke J, Krawczak M. Potentials and limits of pairwise kinship analysis using autosomal short tandem repeat loci. *Int J Legal Med* 2010; 124: 205-215.
168. Tillmar A. *Populations and Statistics in Forensic Genetics*. Linköping University Medical Dissertations No. 1175, Faculty of Health Sciences, University Linköping, Sweden 2010.