

Broj 2 • septembar 2022. N° 2 • September 2022.



Trendovi u **molekularnoj biologiji**
Trends in **Molecular Biology**



Beograd • Belgrade • 2022.
IMGGI • IMGGE

Pedesetogodišnjica osnivanja studijskog programa molekularna biologija i fiziologija Gordana Matić	8	50th anniversary of the molecular biology and physiology study program
TRPV1: Ciljno mesto dejstva lekova u terapiji različitih stanja Branislava Medić Brkić, Katarina Savić Vujović, Dragana Srebro, Sonja Vučković	15	TRPV1: A Promising drug target for the treatment of various conditions
Geni-modifikatori β -talasemijskih sindroma – novi terapijski pristupi Milena Ugrin	32	Gene modifiers in β -thalassemia syndromes – a new therapy approach
Novi uvid u genetiku naslednih perifernih neuropatija Milica Keckarević Marković, Miljana Kecmanović, Dusan Keckarević	51	Genetics of inherited peripheral neuropathies: renewed data
Savremeni pristupi u istraživanju molekularne osnove karcinoma prostate Zorana Dobrijević, Suzana Matijašević-Joković, Ana Branković, Ana Djordjević, Milica Popović i Goran Brajušković	63	Modern approaches in research of the molecular basis of prostate cancer
Uticaj tumorske mikrosredine na razvoj i progresiju maligniteta Ilona Đorić, Tijana Išić Denčić, Sonja Šelemetjev	75	The effects of tumor microenvironment on malignancy formation and progression
Uloga hsa-miR-93-5p u kolorektalnom karcinomu Jovana Despotović	90	Role of hsa-miR-93-5p in colorectal cancer Jovana Despotović
Antitumorski potencijal novih derivata steroidnih hidrazona Marijana B. Živković	104	Antitumor potential of new steroidal hydrazone derivatives
Molekularna dijagnostika glioblastoma – klinički uticaji <i>IDH</i> mutacija i epigenetičkog utišavanja aktivnosti <i>MGMT</i> gena Nikola Jovanović, Tatjana Mitrović	125	Molecular diagnostics of glioblastoma – clinical impact of <i>IDH</i> mutations and epigenetic silencing of <i>MGMT</i>
Molekularni profil timoma Jelena Perić	143	Molecular profile of thymoma
Ekspresija i funkcija insulina u centralnom nervnom sistemu Tamara Dakić, Predrag Vujović	155	Insulin expression and action in the central nervous system
Neuroprotektivni potencijal progesterona Ivana Guševac Stojanović, Dunja Drakulić	168	Neuroprotective progesterone potential
Uloga dehidroepiandrosterona u moždanoj ishemiji/reperfuziji Marina Zarić Kontić, Jelena Martinović	186	Effect of dehydroepiandrosterone on cerebral ischemia/reperfusion
Hemijski profil i antioksidativna aktivnost crvenih vina klonova autohtone i internacionalnih sorti vinove loze Neda Đorđević	206	Chemical profile and antioxidative activity of red wines obtained from autochthonous and international grape clone varieties
Dihidrohalkoni jabuke florizin i floretin kao nove alelopatske supstance Mariana Stanišić, Slavica Ninković, Nevena Banjac	223	Apple dihydrochalcones phloridzin and phloretin as novel allelochemicals
Dosadašnja postignuća na promeni boje cvetova biljaka metaboličkom modulacijom biosinteze karotenoida Milena Trajković, Sladjana Jevremović, Aleksandar Cingel	238	Recent advances in flower color alteration by metabolic manipulation of carotenoid biosynthesis
Bioinformatički alati za analizu mikroRNK Katarina Zeljić	255	Bioinformatics tools for the analysis of microRNA
Marker porekla kao adut u forenzičkim analizama DNK u kompleksnim slučajevima iz perspektive Y hromozoma Miljana Kecmanović, Milica Keckarević Marković, Dušan Keckarević	275	Lineage marker as a key player in complex forensic cases from the perspective of Y chromosome

Predgovor

Uspostaviti tradiciju je mnogo teže nego realizovati inicijativu. Pokazalo se da je prvi broj tematskog zbornika **Trendovi u molekularnoj biologiji 1** pobudio interesovanje naučne zajednice u Srbiji, tako da drugi broj nije bilo teško sastaviti. Broj poglavlja u tematskom zborniku **Trendovi u molekularnoj biologiji 2** je premašio očekivanja. Kao da je Tematski zbornik simbolično postao - Ko je ko u molekularnoj biologiji u Srbiji. I ponovo se pokazalo da se naučnici u našoj zemlji bave aktuelnim istraživačkim temama i aktivno doprinose napretku molekularne biologije na mnogim poljima. I mladi molekularni biolozi su prikazom svojih doktorskih teza pokazali da prate svetske trendove i savremene naučne pristupe.

Posebnost ovog broja je što se objavljuje u vreme kada obeležavamo jubilej, pedesetogodišnjicu Beogradske škole molekularne biologije, o čemu svedoči tekst u kome je prikazan put razvoja programa za molekularnu biologiju na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Pre više godina na jednom naučnom skupu se govorilo o tome kako saznanja iz molekularne biologije prožimaju sve naučne oblasti koje se bave živim organizmima i kako se može predvideti da će njena primena obeležiti novi vek. Iz auditorijuma je stigao komentar: „Proći će i vaše“. Vreme svedoči da je era molekularne biologije tek počela.

„I šta ćemo sad?“

Sonja Pavlović

Iz recenzija Tematskog zbornika ***Trendovi u molekularnoj biologiji***

Drugi broj tematskog zbornika „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ predstavlja nastavak prikazivanja i objavljivanja najznačajnijih naučnih radova proisteklih iz doktorskih disertacija mladih naučnika Srbije, kao i najznačajnijih naučnih rezultata ostvarenih u svetu u oblasti molekularne biologije, u protekloj godini, u kojima su naši naučnici dali svoj doprinos. U ovom broju, prikazano je 18 naučnih radova, od kojih je 12 iz oblasti biomedicine, koji su posvećeni rezultatima ostvarenim u oblasti molekularne biologije retkih bolesti, tumora i centralnog nervnog sistema. Ovi rezultati su od ogromnog značaja za unapređenje dijagnostike i terapije bolesti.

Rezultati koje su naši naučnici ostvarili u oblasti molekularne biologije biljaka prikazani su kroz tri rada, a akcenat u njima je na mogućnosti primene tih rezultata u oblasti ekologije, hortikulture i unapređenja zdravlja ljudi (potraga za ekološki prihvatljivim bioherbicidima, modifikacija boje cveta, biološka aktivnost prirodnih supstanci).

Dva rada su posvećena naprednim metodama u oblasti molekularne biologije i prikazana su u posebnom poglavlju, što smatram veoma važnim.

Posebno bih istakla poglavlje u kojem je prikazan jedan od najznačajnijih naučnih rezultata u svetu u protekloj godini (otkiće receptora za temperaturu i dodir), za koji je dodeljena Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu 2021. godine. Uvodno poglavlje ovog tematskog zbornika posvećeno je značajnom jubileju – pedesetogodišnjici Beogradske škole molekularne biologije, i u njemu je prikazan razvojni put studijskog programa Molekularna biologija i fiziologija na Univerzitetu u Beogradu – Biološkom fakultetu.

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ nastavlja svoju misiju naučne avangarde započetu prošlogodišnjim brojem. Prikazivanjem najkvalitetnijih i najznačajnijih naučnih rezultata ostvarenih u oblasti molekularne biologije u protekloj godini u kojima su naši mladi naučnici dali svoj ogromni doprinos, prenose se informacije širem krugu istraživača i zaposlenih u različitim oblastima (medicina, farmacija, poljoprivreda), čime se otvaraju mogućnosti za saradnju, a samim tim za primenu rezultata, kao i za nova istraživanja.

Svojom koncepcijom i odabirom radova „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ prate napredak u oblasti molekularne biologije i ne samo da prenose najznačajnije naučne rezultate, već i inspirišu i podstiču nova istraživanja i šire interesovanje za ovu veoma značajnu naučnu oblast. Ovaj zbornik opravdava svoj naziv i nadam se da će se nastaviti trend njegovog objavljivanja i narednih godina.

Dr Svetlana Radović, redovni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Monografija/Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ je drugi broj u nizu izdanja koje ima za cilj da prikaže naučne rezultate iz oblasti molekularne biologije koje su ostvarili naučnici iz Srbije u prethodnoj godini. Sačinjen je od 18 poglavlja, od kojih 8 predstavlja revijske radove proizašle iz doktorskih disertacija mladih doktora nauka u kojima je prikazan njihov doprinos određenoj naučnoj oblasti molekularne biologije koja je povezana sa temom njihove disertacije. Preostalih 7 poglavlja su prikazi aktuelnih tema iz molekularne biologije u kojima su naši naučnici dali svoj značajni doprinos. Uvodno poglavlje je posvećeno jubileju, pedesetogodišnjici Beogradske škole molekularne biologije, u kome je prikazan put razvoja programa za molekularnu biologiju na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Veliki broj poglavlja iz Zbornika (12) je posvećen istraživanjima iz oblasti biomedicine. Posebno je značajno poglavlje u kome je prikazan doprinos naših istraživača u oblasti kojoj je dodeljena Nobelova nagrada iz medicine za 2021. godinu (receptori za temperaturu i dodir).

Doprinos koji je molekularna biologija dala modernoj medicini je izuzetno veliki. Danas su u kliničkoj praksi u svetu mnogobrojni dijagnostički, prognostički i terapijskih molekularni markeri. Posebno je značajno što je medicina u Srbiji pratila svetske trendove, i to zahvaljujući i velikim naporima molekularnih biologa u našoj zemlji. Ovaj Tematski zbornik je svedočanstvo o značajnim postignućima molekularnih biologa u Srbiji koji su doneli napredak našoj medicini i drugim naučnim oblastima.

Monografija/Zbornik je izuzetno zanimljivo koncipiran sa sadržajem koji je na visokom naučnom nivou i koje je značajan izvor informacija za veliki broj naučnika u Srbiji čija se istraživanja više ne mogu zamisliti bez molekularne biologije. Primeri primenljivosti rezultata istraživanja u praksi (medicinskoj i drugima) je poseban kvalitet ovog Zbornika.

Prvi broj Tematskog zbornika „Trendovi u molekularnoj biologiji 1“ je doživeo veliko interesovanje. Interesovanje autora da objave svoj doprinos svetskoj nauci u broju 2 govori da je ovakav sadržaj bio neophodan našoj naučnoj javnosti. Sigurno je da će ovako koncipiran Tematski zbornik imati budućnost, jer je napredak medicine i drugih oblasti (biotehnologija, poljoprivreda, farmacija) nemoguće zamisliti bez novih dostignuća molekularne biologije

**Dr Vesna Škodrić Trifunović, redovni profesor,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu**

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ sadrži naučne rezultate koji su prepoznati na svetskom nivou, a koje su istraživači iz Srbije ostvarili u prethodnoj godini iz ove oblasti. Zbornik je sačinjen od 18 poglavlja, preglednih radova, grupisanih u pet celina. Prva celina je posvećena važnom jubileju, pedesetogodišnjici osnivanja Beogradske škole molekularne biologije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, dok druga sadrži prikaz rezultata naših istraživača iz oblasti fiziologije i medicine za koju je u 2021. godini dodeljena Nobelova nagrada. Najveći broj poglavlja je u okviru treće celine koja se bavi biomedicinom i to molekularnom biologijom retkih bolesti, tumora i centralnog nervnog sistema. Preostale dve celine su posvećene molekularnoj biologiji biljaka i naprednim metodama molekularne biologije. Važno je istaći da su mladi doktori nauka aktivno učestvovali u izradi ovog Zbornika, tako da 8 poglavlja u okviru biomedicine i molekularne biologije biljaka predstavljaju revijske radove proizašle iz njihovih doktorskih disertacija.

Značaj ovog Zbornika je višestruk. Najpre, već drugu godinu za redom se objavljuju najrelevantnija saznanja iz navedenih oblasti koja su proizašla iz rada istraživača iz Srbije i dostupna su široj javnosti na maternjem jeziku. Takođe, svoje radove su napisali istraživači iz različitih naučnih instituta (5) i fakulteta (5) iz Srbije, što ohrabruje da će se u našoj zemlji i dalje nastaviti sa istraživanjima u molekularnoj biologiji koja su aktuelna u svetu.

„Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ je Tematski zbornik u kome su objedinjeni rezultati fundamentalnih i primenjenih istraživanja u molekularnoj biologiji ostvarenih u našoj zemlji u prethodnoj godini. Korišćenjem najnovijih metodoloških pristupa u ovoj oblasti, ali i bioinformatičkih i drugih softverskih alata, postignut je značajan napredak u dijagnozi i primeni novih strategija lečenja mnogih bolesti, forenzičkim analizama, razvoju novih lekova. Ovaj sveobuhvatni prikaz istraživanja, koja se aktivno sprovode u naučnim institutima i na fakultetima u Srbiji, doprinosi saznanjima o značaju koji molekularna biologija ima kako u humanoj i veterinarskoj medicini, poljoprivredi, farmaciji, tako i u razvoju biotehnologije, očuvanju životne sredine i biodiverziteta.

Poseban doprinos Zbornika se ogleda u tome što se u njemu nalaze aktuelni podaci o dostupnosti navedenih savremenih metodologija, čime se otvaraju realne mogućnosti za uspostavljanje novih saradnji među istraživačima, kao i u uspostavljanju inter- i multi-disciplinarnosti i daljem razvoju nauke u Srbiji.

Dr Gordana Nikčević, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Marker porekla kao adut u forenzičkim analizama DNK u kompleksnim slučajevima iz perspektive Y hromozoma

Miljana Kecmanović, Milica Keckarević Marković, Dušan Keckarević

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet, Katedra za biohemiju i molekularnu biologiju,

Centar za forenzičku i primenjenu molekularnu genetiku

Kontakt: miljana@bio.bg.ac.rs

Apstrakt

Kako se Y hromozom kroz generacije ne menja rekombinacijama, prenosi se uglavnom nepromenjen sa oca na sina. Haplotipovi dobijeni kombinovanom analizom kratkih tandemskih ponovaka na Y hromozomu imaju široku primenu u forenzičkim analizama za definisanje paternalne linije muškog donora biološkog traga, posebno u slučajevima gde standardna analiza autozomnih markera nije dovoljno informativna. Y vezani haplotipovi se koriste i u evolucionim i genealoškim studijama, ali se za rekonstrukciju filogenije Y hromozoma koristi analiza polimorfizama pojedinačnih nukleotida. Promene na Y hromozomu se ipak dešavaju usled mutacija što može da dovede do diferencijacije Y vezanih haplotipova između oca i sinova. Tako mutacije u lokusima sa kratkim tandemskim ponovcima mogu da omoguće identifikaciju muškarca u okviru jedne paternalne linije, ali mogu i da dovedu do progrešnog isključenja biološkog srodstva. Usled toga je za tačnu interpretaciju genetičkih profila neophodna precizna procena stope mutacije pojedinačnih lokusa, za šta se koriste studije parova otac-sin ili velikih porodični stabala.

Ključne reči: Y hromozom; poreklo; stopa mutacije; forenzičke analize DNK

Lineage marker as a key player in complex forensic cases from the perspective of Y chromosome

Miljana Kecmanović, Milica Keckarević Marković, Dušan Keckarević

University of Belgrade – Faculty of Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center for Forensic and Applied Molecular Genetics

Correspondence: miljana@bio.bg.ac.rs

Abstract

Y chromosome is transmitted mostly unchanged from father to son due to the absence of recombination events. Haplotypes composed of Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms are widely used to define paternal line of unknown male perpetrator in forensic analysis, especially when standard analysis of autosomal markers is not informative enough. Y-chromosomal haplotypes are also used in evolutionary and genealogical studies, but single nucleotide polymorphisms are more suitable for the reconstruction of the Y chromosome phylogeny. However, Y chromosome changes due to mutations, which could lead to differentiation of Y haplotypes between father and sons. Thus, mutations in short tandem repeats loci can enable the identification of a man within a single paternal line, but they could also lead to an erroneous exclusion of biological paternity. Reliable mutation rates, for the proper use and accurate interpretation of genetic profiles, could be estimated from multi-generation pedigrees or father-son pairs.

Keywords: Y chromosome; ancestry; mutation rates; forensic DNA analysis

Svaki čovek, bez obzira na pol, u nukleusima svojih somatskih ćelija ima 22 para autozomnih hromozoma. Hromozomi jednog para su homologni, od kojih jedan potiče od oca, a drugi od majke. Između homolognih hromozoma dolazi do razmene genetičkog materijala tokom mejoze, čime se obezbeđuje genetički diverzitet. Dvadeset treći par hromozoma u nukleusima somatskih ćelija čini par polnih hromozoma, koji mogu biti homologni (X i X) kod žena ili nehomologni (X i Y) kod muškaraca [1]. Kako Y hromozom nema svog homolognog para praktično se nepromenjen prenosi sa oca na sina, te su informacije koje nosi isključivo potpis paternalne linije.

Struktura Y hromozoma i obrazac nasleđivanja

Y hromozom čoveka dugačak je 60 miliona baznih parova (bp) i jedan je od najmanjih hromozoma humanog genoma. Terminalni regioni njegovog dugog i kratkog kraka, označeni kao pseudoautozomni regioni (eng. *Pseudoautosomal Regions*, **PAR**), čine oko 5% sekvence Y hromozoma. Pseudoautozomni regioni sadrže 10 - 12 gena od kojih svi imaju pandane na X hromozomu. Usled toga, ovi regioni na hromozomima X i Y mogu da se rekombinuju tokom mejoze, slično kao homologni autozomni hromozomi [2, 3]. Pseudoautozomni regioni ograničavaju nerekombinujući region Y hromozoma (eng. *Non-recombining Portion of the Y Chromosome*, **NR**) koji čini oko 95% njegove sekvence. Ovaj region predstavlja "nerekombinujuću pustinju" jer ne podleže rekombinaciji tokom mejoze usled odsustva homologije sa X hromozomom. Međutim, kako je ustanovljeno da između sekvenci NRY može doći do nerekipročne rekombinacije (genska konverzija između ponovljenih sekvenci istog hromozoma), ovaj region se označava kao region specifičan za muškarce (eng. *Male-Specific Y Region*, **MSY**) [4].

U okviru MSY razlikuju se euhromatinski i heterohromatinski regioni. Više od polovine heterohromatina čine različite ponovljene sekvence bez kodirajuće funkcije, čije delecije nemaju nikakav vidljiv fenotipski efekat [1]. Sa sekvenci iz euhromatinskog regiona MSY prepisuje se 156 transkripcionih jedinica, od kojih bar polovina kodira proteine. Od ukupnog broja od 78 protein - kodirajućih jedinica, oko 60 se može svrstati u neku od 9 genskih familija specifičnih za MSY, čiji članovi poseduju preko 98% identičnu sekvencu. Preostalih 18 gena prisutno je u jednoj kopiji, te se može reći da MSY kodira 27 različitih proteina ili familija proteina [4]. Katalog sekvenci euhromatina obuhvata tri klase: sekvence transponovane sa X hromozoma, X - degenerisane sekvence, i klasu amplikona, sastavljenu uglavnom od sekvenci koje pokazuju čak 99,9% identičnosti sa drugim sekvencama u MSY, a koje se održavaju čestim Y - Y genskim konverzijama. Amplikoni i palindromske sekvence čine Y hromozom podložnim samorekombinaciji tokom spermatogeneze što za posledicu ima intrahromozomske delecije. Takve delecije uzrok su varijacija u broju kopija gena Y hromozoma, a mogu uzrokovati i neplodnost muškarca [5].

Y hromozom je haploidan i prenosi se isključivo po muškoj liniji iz generacije u generaciju praktično nepromenjen, usled odsustva homologne rekombinacije. Jedini faktor koji uzrokuje varijacije između generacija su (retke) mutacije. Tako Y hromozom nosi zapis svih mutacionih događaja oslikavajući istoriju paternalne linije [6]. Navedeno čini analizu Y hromozoma nezaobilaznim alatom kada su u pitanju rekonstrukcije puteva migracije muškaraca u prošlosti, analiza drevne DNK, genetička genealogija, slučajevi spornog očinstva gde se koristi kao pomoćna alatka, utvrđivanje srodstva u masovnim nesrećama, i naravno, forenzičke DNK analize [7].

AMEL lokus i pol

Od posebnog značaja za forenzičke analize DNK bilo je otkriće amelogenin genskog markera (*AMEL*) za utvrđivanje pola. Amelogenin genski lokus podrazumeva dva homologna gena prisutna na X i Y hromo-

zomima: *AMELY* kodira protein uključen u demineralizaciju zubne gledi i ima paralog na X hromozomu (*AMELX*). Prvi intron *AMELX* je šest bp kraći, te je dizajniran poseban set prajmera za umnožavanje *AMEL* lokusa u ovom regionu oba hromozoma, dajući ampikone od 106 bp i 112 bp sa X i Y hromozoma, redom [8]. Prajmeri za umnožavanje *AMEL* standardni su deo svakog kompleta hemikalija koji se koristi za utvrđivanje DNK profila analizom autozomnih lokusa, s obzirom da može da pruži informaciju o polu donora biološkog traga. Međutim, kako retka delecija gena za amelogenin na Y hromozomu dovodi do odsustva ampikona Y hromozoma [9], danas je uglavnom još jedan lokus sa Y hromozoma deo standardnog kompleta za DNK tipizaciju, kako se, u slučaju odsustva ampikona od 112 bp, ne bi izveo pogrešan zaključak da se radi o ženskom donoru biološkog traga [10].

Polimorfizmi Y hromozoma

Potruga za polimorfizmima specifičnim za Y hromozom bila je usmerena prvobitno na polimorfizme u dužini restrikcionih fragmenata (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphisms*, RFLPs). Detektovana su samo dva Y RFLP [11], a daljim analizama je pokazano da Y hromozom ima mali broj ovakvih polimorfizama u poređenju sa drugim hromozomima [12]. Zahvaljući napretku tehnologije i razvoju novih metoda, otkriveni su novi polimorfizmi Y hromozoma. Danas se u analizi Y hromozoma koriste dva tipa polimorfizama u okviru MSY: sporomutirajući polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (eng. *Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP) i brže mutirajući kratki tandemske ponovci (eng. *Short Tandem Repeats*, STRs). Kako se Y-STR i Y-SNP odlikuju različitim stopama mutacije koriste se i za izučavanje evolucionih događaja na različitim vremenskim skalama [13]. Poseban napredak u otkriću novih polimorfizama Y hromozoma donelo je masivno paralelno sekveniranje (eng. *Massive Parallel Sequencing*, MPS). Takođe, lako dostupni servisi koji vrše sekveniranje Y hromozoma MPS-om na lični zahtev, značajno su proširili baze podataka i pružili nove informacije o Y-SNP i Y-STR lokusima [14].

Detekcija Y-SNP-ova uglavnom se obavlja metodom minisekveniranja koja podrazumeva elongaciju specifičnog prajmera za jedan nukleotid, upravo na mestu gde se nalazi SNP od interesa. Poseban vid ove reakcije koji je široko u upotrebi, *SNaPshot* (*ThermoFisher Scientific*, SAD), podrazumeva korišćenje obeleženih dideoksi nukleotida i detekciju alela na osnovu emitovane fluorescencije, dok se analiza dobijenih fragmenata vrši kapilarnom elektroforezom [6].

Detekcija alela za svaki Y-STR lokus vrši se određivanjem dužine fragmenata dobijenih lančanom reakcijom polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) kapilarnom elektroforezom. Danas su dostupni kompleti hemikalija kojima je moguće istovremeno umnožiti veći broj Y-STR lokusa u jednoj reakciji. Takođe, nova tehnologija sekveniranja, osim otkrića novih polimorfizama, našla je primenu i u analizi Y hromozoma. Primenom MPS-a moguće je dobiti podatke o dužini fragmenata kao i standardno kapilarnom elektroforezom, ali je pored toga moguće utvrditi promene sekvence samih ponovaka i okolnih regiona. MPS je veoma privlačna metoda s obzirom da pruža više informacija i omogućava rezoluciju alela koji se kapilarnom elektroforezom detektuju kao aleli iste dužine. Uprkos tome, kapilarna elektroforeza je i dalje zlatni standard kada je u pitanju detekcija minimalne količine muške komponente u muško-ženskim mešavinama jer MPS za sada zahteva veće količine DNK materijala za analizu [15].

Y hromozom u forenzici i tumačenju prošlosti

Ključni zahtev forenzičkih analiza DNK je da se dobije visokodiskriminativan DNK profil koji je pogodan za identifikaciju osobe. Analiza autozomnih STR lokusa je sama po sebi dovoljna za identifikaciju, jer je DNK

profil svake osobe jedinstven. Nasuprot tome, analizom Y vezanih STR lokusa, posebno onih koji se odlikuju relativno niskom stopom mutacija ($\sim 10^{-3}$ po markeru po generaciji) [16, 17] dobija se haplotip koji definiše samo paternalnu liniju, ali nema moć identifikacije osobe. Stoga je Y hromozom u forenzičkim istragama dugo bio ignorisan. Naime, ukoliko se Y haplotip osumnjičene osobe poklopi sa Y haplotipom traga, ne može se reći da je ta osoba donor biološkog materijala. Kako svi njegovi srodnici po muškoj liniji imaju isti Y haplotip, ni oni se ne mogu isključiti kao potencijalni donori. S druge strane, nepodudaranje Y haplotipova biološkog traga i osumnjičene osobe omogućava da se osoba isključi kao donor biološkog traga. I u slučajevima utvrđivanja spornog očinstva mora se uzeti u obzir da rezultat zasnovan isključivo na Y-STR haplotipovima ne isključuje kao mogućeg oca nijednog muškog srodnika u istoj paternalnoj liniji. Međutim, značaj analize Y-STR lokusa kod utvrđivanja spornog očinstva, odnosi se pre svega na situacije kada potencijalni otac nije dostupan za analizu, ali jesu njegovi srodnici po muškoj liniji. Kao i u krivičnim istragama, nepodudaranje Y haplotipova podrazumeva isključenje očinstva, dok uslovno istovetni Y haplotipovi mogu da ukažu da je reč o istoj muškoj liniji i da upotpune informaciju dobijenu analizom autozomnih STR lokusa ukoliko postoji.

Binarne markere, poput SNP, karakteriše niska stopa mutacija (reda veličine 10^{-8} po bazi po generaciji) [18], zbog čega se obično smatraju jedinstvenim događajima u evoluciji čoveka. Za razliku od tačkastih polimorfizama u drugim delovima genoma, Y-SNP se akumuliraju u MSY značajno brže, što može da se objasni velikim brojem ćelijskih deoba prilikom spermatogeneze i odsustvom rekombinacije u ovom regionu. U Projektu 1000 genoma sekvencirano je 1244 humanih Y hromozoma i ustanovljeno preko 65000 SNP-ova [19]. Osim otkrića novih polimorfizama Y hromozoma, Projekat 1000 genoma pružio je i preciznije procene mutacionih stopa za Y-SNP lokuse. Zavisno od primenjenog pristupa, one se kreću u rasponu od $8,71 \times 10^{-10}$ [20] do $7,6 \times 10^{-10}$ [21] po bazi po generaciji. Zahvaljujući niskoj stopi mutacije, kombinacije Y-SNP markera definišu linije porekla – *haplogrupe*. Muškarci koji imaju istu kombinaciju SNP-ova na Y hromozomu pripadaju istoj *haplogrupi*. Haplogrupe se koriste za konstruisanje filogenetskog stabla Y hromozoma i tumačenje prošlosti ljudi. Precizna procena mutacionih stopa Y-SNP-ova potrebna je za finu kalibraciju Y filogenetskog stabla i određivanje starosti poslednjeg zajedničkog pretka u okviru svake haplogrupe [22].

Arhitektura filogenetskog stabla Y hromozoma obuhvata 20 osnovnih *haplogrupa* ili grana, koje se označavaju slovima od A-T. Duboke grane filogenetskog stabla definišu Y SNP-ovi koji su nastali toliko davno da su zajednički za Y hromozome velikog broja muškaraca. U okviru svake grane vremenom su se javljali novi SNP-ovi koji su doveli do daljeg grananja, definišući nove, mlađe grane, koje su rasprostranjene samo u određenim geografskim regionima. Neki SNP-ovi su nastali toliko skoro da su prisutni samo u nekim porodicama ili čak samo kod određene osobe (privatne mutacije), određujući tako potencijalno najmlađe grane Y filogenetskog stabla. Određivanje geografskog regiona odakle potiču preci neke osobe, tj. njegovog biogeografskog porekla, od značaja je u forenzičkim analizama jer mogu da pruže istražne smernice ka pronalaženju nepoznatog počinioca [23, 24].

Y-SNP haplogrupe i njihova globalna distribucija

Populacione studije su pokazale filogeografsku struktuiranost Y hromozoma, odnosno omogućile su praćenje biogeografske rasprostranjenosti njegovih pojedinih grana [25]. Tačnije, analiza rasprostranjenosti osnovnih i mlađih grana, koje su se formirale tokom istorije i migracija ljudi, pokazala je da su pojedinci koji žive na istom kontinentu sličniji među sobom u poređenju sa onima nastanjenim na drugim kontinentima. Ustanovljeno je, na primer, da su najdublje grane filogenetskog stabla Y hromozoma, haplogrupe A i B, ograničene na Afriku [26, 27]. Haplogrupa B je naročito zastupljena u Etiopiji i Sudanu [27]. Grane haplogrupe

C i D zastupljene su u različitim delovima Azije [28-31]. Haplogrupa E je veoma razgranata, sa granama E1 i E2 prisutnim u Severoistočnoj Africi i granom E3 koja pokazuju široku geografsku rasprostranjenost. Naime, grana E3a je zastupljena u Africi i među afro-amerikancima, dok je E3b zastupljena u Severnoj Africi, Zapadnoj Evropi i na Bliskom istoku [27, 32]. Haplogrupa I je ekskluzivno evropska. Smatra se da je nastala na tlu Evrope, sa granom I1 koja je naročito zastupljena na severu Evrope i granom I2 koja je zastupljena sa visokom učestalošću na teritorijama koje naseljavaju slovenski narodi [33]. Takođe, haplogrupa R je sa svoje dve osnovne grane, R1a i R1b, posebno zastupljena na teritoriji Evrope. Procenjuje se da preko 100 miliona zapadnih Evropljana pripada R1b grani [34], dok je R1a prisutna u istočnoj Evropi među slovenskim narodima, ali i u Aziji [35].

Y-STR haplotipovi

Drugi tip polimorfizama koji se koristi u analizi Y hromozoma su Y-STR-ovi, zastupljeni u manjem broju u poređenju sa Y-SNP-ovima. Sekvenciranjem čitavog Y hromozoma primenom MPS utvrđeno je da katalog sekvenci Y hromozoma sadrži oko 4500 Y-STR-ova [36]. Kombinovanom analizom Y-STR lokusa dobija se Y vezani *haplotip* koji definiše određenu paternalnu liniju i ima široku primenu u forenzici, složenim slučajevima spornog očinstva i utvrđivanju srodstva. Svi haplotipovi koji imaju iste Y-SNP-ove pripadaju istoj *haplogrupi*. Kako se svaka mutacija u okviru Y-STR lokusa dešava na nekom Y hromozomu sa određenom Y-SNP haplogrupom, varijacije Y-STR alela su duboko podeljene po haplogrupama [37], zbog čega se Y-STR haplotipovi mogu koristiti sa različitom preciznošću za predviđanje Y haplogrupa i u odsustvu Y-SNP genotipova [38-40]. S druge strane, varijacije Y-STR alela u okviru haplogrupe mogu da pruže informaciju o starosti haplogrupe, s obzirom da će se starije haplogrupe odlikovati većim diverziteom Y-STR haplotipova [14].

Primenu u forenzici Y-STR lokusi našli su odmah nakon što je okarakterisan prvi Y-STR, *DYS19* [41, 42], a vremenom su pažljivo selektovani novi iz skupa sekvenci kandidata iz MSY regiona i dodavani komercijalno dostupnim kompletima hemikalija za utvrđivanje Y haplotipova. Prvi slučaj u kome je korišćena analiza Y-STR lokusa podrazumevao je uzorak vaginalnog brisa silovane i ubijene žene koji je metodom diferencijalne ekstrakcije [43] razdvojen na frakcije spermatozoidnih i nespermatozoidnih (epitelnih) ćelija. U frakciji nespermatozoidnih ćelija nije bilo moguće umnožiti analizirani Y-STR lokus PCR-om, dok je analiza istog lokusa u spermatozoidnoj frakciji vaginalnog brisa dala rezultat. Dobijeni alel razlikovao se od alela dobijenog analizom nespornog uzorka osumnjičene osobe, te je prva primena analize Y-STR lokusa podrazumevala isključenje osumnjičene osobe kao potencijalnog donora biološkog traga. Takođe, tom prilikom je pokazano da je moguće detektovati samo DNK poreklom od muške osobe u nebalansiranoj muško-ženskoj mešavini, kada je praktično nemoguće identifikovati muškog doprinosioca analizom autozomnih STR lokusa. Nedvosmislena detekcija muške komponente u tragovima u kojima se očekuju muško-ženske mešavine sa predominantnim sadržajem biološkog materijala poreklom od ženske osobe i minimalnom količinom materijala poreklom od muške osobe, poput uzoraka iz seksualnih napada ili podnokatnog sadržaja, i dalje je glavno polje primene Y-STR haplotipizacije. Tako je studija na uzorku od preko 2000 bioloških tragova iz skoro 300 slučajeva seksualnih napada pokazala da bi jedna desetina ostala nerešena da pored standardnog utvrđivanja DNK profila analizom autozomnih STR lokusa, nije primenjena i analiza Y vezanih haplotipova [44].

Forenzička zajednica je 1997. godine definisala minimalni set Y-STR markera koji obuhvata devet lokusa [45]. Kako bi se postigla bolja rezolucija paternalne linije povećan je broj Y-STR markera u kompletima hemikalija, te su tako danas dostupni i oni sa 27 Y-STR markera. Povećanje broja Y-STR markera ima tehnička ograničenja jer se ne mogu neograničeno dodavati markeri kompletima koji se analiziraju kapilanom elek-

torforezom, što je metoda izbora u rutinskom radu u forenzici [46]. Međutim, bolja rezolucija paternalne linije može se postići i upotrebom markera koji se odlikuju višom stopom mutacije. Tako, osim većeg broja markera, komercijalni kompleti koji su danas u upotrebi imaju i nekoliko markera koji se odlikuju višom stopom mutacije. Stopa mutacije Y-STR lokusa odnosi se na promenu broja ponovaka, posebno ponovaka u neprekinutim nizovima, u kojima veći broj ponovaka dovodi do češćeg proklizavanja DNK polimeraze tokom replikacije [47, 48]. Lokusi koji se odlikuju višom stopom mutacija pogodniji su za identifikaciju paternalne linije donora biološkog traga i diferencijaciju srodnika iste paternalne linije dok su lokusi koji se odlikuju niskom ili umerenom stopom mutacija pogodniji za asocijaciju muškarca sa paternalnom linijom pri utvrđivanju očinstva/srodstva [49].

Značaj utvrđivanja stopa mutacija Y-STR lokusa

Konvencionalno korišćeni kompleti hemikalija za utvrđivanje Y haplotipova imaju dva ograničenja zbog relativno niske stope mutacija korišćenih Y-STR lokusa: nemogućnost rezolucije paternalne linije u situacijama kada se utvrde identični haplotipovi kod nesrodnih muškaraca kao posledica povratnih mutacija ("slučajno identični haplotipovi") i nemogućnost da se napravi razlika među haplotipovima srodnika iz iste paternalne linije ("haplotipovi identični po poreklu"). [50]. Napredak u diferencijaciji paternalnih linija postignut je identifikacijom 13 brzo mutirajućih (eng. *Rapidly Mutating*, RM) Y-STR markera [50]. Ovi markeri odlikuju se stopom mutacija većom od 10^{-2} po markeru po mezozi [48, 50], a njihov značaj u diferencijaciji muških srodnika, ali i nesrodnih muškaraca čiji su "haplotipovi slučajno identični", pokazan je u brojnim studijama koje su usledile [7, 51-56]. Nekoliko od 13 prvobitno opisanih RM markera postao je deo komercijalnih kitova [57, 58], međutim njihov relativno mali broj u komercijalnim kitovima predstavlja ograničenje za diferencijaciju bliskih srodnika po muškoj liniji. Kako je upotrebom 13 RM Y-STR markera utvrđena stopa diskriminacije muških srodnika, udaljenih jednu do četiri mezoze, koja je iznosila od 20% do 60% [51, 56, 60], pažnja je usmerena ka selekciji novih kako bi se mogućnost diskriminacije povećala. Identifikovano je potom 12 dodatnih brzo mutirajućih Y-STR markera, a kombinacijom opisanih 25 RM Y-STR-ova kapacitet diskriminacije srodnika iste paternalne linije udaljenih do četiri mezoze povećan je na 90% [61]. Nedavno je razvijen i validiran RMplex komplet kojim je omogućena analiza 30 RM Y-STR-ova [62].

S druge strane, ono što je nedostatak Y-STR lokusa kod identifikacije, predstavlja prednost kada je u pitanju utvrđivanje očinstva/srodstva i identifikacija žrtava masovnih nesreća [46]. U ovom slučaju prednost imaju Y-STR lokusi koji se odlikuju niskom ili umerenom stopom mutacija. Međutim, kako je povećan broj lokusa koji su deo standardnih kompleta povećana je i mogućnost da se dobiju haplotipovi koji će se razlikovati na određenim lokusima [46]. Kada se Y haplotipovi potencijalnog oca i sina (ili pripadnika iste paternalne linije kod utvrđivanja srodstva) razlikuju na nekom od analiziranih lokusa, postavlja se pitanje da li je ta razlika posledica mutacija ili se zapravo ne radi o ocu i sinu. Ranije je predloženo pravilo da se isključivanje očinstva vrši ukoliko se haplotipovi razlikuju na minimum 3 Y-STR lokusa. Međutim, ovakav model morao je da pretrpi promenu nakon rezultata više studija. Tako je u studiji u kojoj je korišćen komplet za analizu 17 Y-STR lokusa na 1730 parova otac-sin zabeleženo da je jedan par imao mutaciju na 3, dok su dva para imala mutaciju na 2 od 17 lokusa [16]. Analizom dodatnih 169 lokusa kod istih parova, 123 parova otac-sin je imalo mutacije na 3 lokusa, 42 para na 4 lokusa, a po 3 para na čak 5, 6, 7 ili 8 lokusa [17]. Ovakvi rezultati pokazuju da korišćenje fleksibilnog modela za isključenje očinstva ima više smisla. Takav model podrazumeva da se uzme u obzir ukupan broj lokusa koji se analiziraju, njihove stope mutacija, kao i razlike u broju ponovaka na alelima koji se ne podudaraju s obzirom da većina mutacija STR lokusa podrazumeva promenu u jednom ponovku [46].

Za ispravnu i tačnu interpretaciju dobijenih profila neophodne su pouzdane procene stopa mutacija [63]. Poznavanje mutacionih stopa potrebno je i za procenu vremenske udaljenosti do najskorijeg zajedničkog pretka u genealoškim studijama. Za procenu stopa mutacija koriste se različiti pristupi. Jedan pristup podrazumeva utvrđivanje broja mutacija u parovima otac-sin [16, 17, 64, 65]. Kako bi se postigla što preciznija procena, potrebno je analizirati veliki broj parova otac-sin. Drugi pristup podrazumeva analizu velikih porodičnih stabala koje omogućavaju utvrđivanje stopa mutacija Y-STR lokusa korišćenjem ograničenog seta uzoraka koji su razdvojeni velikim brojem mejoza [7, 56, 66]. Međutim, oba pristupa imaju svoja ograničenja. Analiza parova otac/sin ne uzima u obzir mogući uticaj različitih faktora na vremenskoj skali na stope mutacije, dok se za velika i duboka porodična stabla ancestralni haplotip rekonstruiše na osnovu haplotipova savremenika dostupnih za analizu, te su moguće greške u proceni mutacionih stopa zbog postojanja skrivenih mutacija u oba smera (povećanje i smanjenje broja ponovaka) i paralelnih mutacija u različitim granama stabla, koje nije moguće detektovati [60]. Stoga, posebno za RM Y-STR, direktno praćenje transmisija kod dovoljno velikog broja parova otac-sin, predstavlja bolji pristup za utvrđivanje stopa mutacija. Štaviše, samo ovaj pristup omogućava da se nedvosmisleno odredi za koliko se povećao odnosno smanjio broj ponovaka, kao i da se okarakteriše smer mutacija (smanjenje ili povećanje broja ponovaka) [61].

Poklapanje Y-STR haplotipova – značaj velike baze podataka

U istrazi jednog krivičnog dela utvrđeno je da se Y haplotip biološkog traga poklapa sa Y haplotipom osumnjičene osobe na 23 Y-STR lokusa [67]. Kako su i sedmorica njegovih bliskih rođaka po muškoj liniji imali identične haplotipove, kombinacijom dostupnih kompleta hemikalija i 13 RM Y-STR utvrđeni su haplotipovi na 47 Y-STR markera, ali ponovo i njihovo međusobno poklapanje [67]. Međutim, na osnovu učestalosti haplotipa u populaciji i primenom odgovarajućeg matematičkog modelovanja [68] utvrđeno je da je šansa da se slučajnim mutacijama generišu identični haplotipovi tako visoke rezolucije van šire porodice veoma mala [67]. Tome u prilog dalje govore i rezultati studije u kojoj je analizirano 128 potomaka jednog muškarca, u kojoj je pokazano da 12 savremenika, razdvojenih od 9 do 18 mejoza, ima identičan haplotip na 36 Y-STR markera [56]. S druge strane, pripadnici iste muške linije mogu se razlikovati na čak 18 od ukupno 36 analiziranih Y-STR markera, uključujući i 13 RM [56], što sve treba uzeti u obzir prilikom forenzičkih istraga i utvrđivanja srodstva.

Kako bi se ispravno tumačili rezultati i procenila težina dokaza u slučajevima kada se utvrdi poklapanje Y haplotipova pri ispitivanju srodstva ili Y haplotipa osumnjičene osobe sa Y haplotipom biološkog traga, potrebno je poznavanje učestalosti Y haplotipova u opštoj populaciji. Saradnjom preko trideset forenzičkih i antropoloških institucija iz Evrope, iniciranom naučnicima sa Univerziteta Šarite (Charité University) iz Berlina, napravljena je kolekcija od preko 5000 minimalnih haplotipova. Na taj način je 2000. godine formirana, sada najveća, baza podataka koja sadrži Y-STR haplotipe anonimnih osoba iz svih delova sveta (*Y chromosome haplotype reference database*, YHRD) [69]. Višegodišnjim dopunjavanjem i proširivanjem podataka, pre svega kada je u pitanju broj Y-STR lokusa koji su deo haplotipa, poslednji put je dopunjena u februaru 2022. godine, što je bilo njeno 67. izdanje. (www.yhrd.org).

Biogeografsko poreklo mnogo bolje oslikavaju Y-SNP markeri u poređenju sa Y-STR markerima zbog niže stope mutacija. Međutim, sa porastom broja haplotipova u YHRD, postajala je jasno uočljiva biogeografska struktuiranost i Y-STR haplotipova širom sveta [68]. Skup Y-STR profila rasprostranjenih na nekoj teritoriji, a koji su deo jedne ili nekoliko zajedničkih linija porekla čiji su nosioci tu teritoriju nastanili u dalekoj prošlosti, označava se kao "metapopulacija" [70, 71]. Metapopulacije su vremenom stabilizovane kultur-

ološkim i sociološkim faktorima uključujući zajednički jezik [72, 73], patrilokalnošću društvenih zajednica [74] i/ili geografskim barijerama [75]. Kako bi bolje oslikavala Y-specifične strukture metapopulacija, reorganizovana je i YHRD baza, te je danas pretragom iste moguće utvrditi učestalost određenog haplotipa u okviru metapopulacije. Ovo je od posebnog značaja u istragama krivičnih dela i tumačenju dobijenog Y-STR haplotipa, s obzirom da je prava slika njegove učestalosti u okviru konkretne metapopulacije, a ne svih svetskih metapopulacija, gde se taj haplotip možda uopšte ne javlja. Da li će se pretragom baze utvrditi poklapanje, kao i da li su u pitanju "slučajno identični haplotipovi" ili "haplotipovi identični po poreklu" zavisi od broja lokusa obuhvaćenih haplotipom, njihove stope mutacija, veličine baze i struktuiranosti same populacije [67]. Veći broj markera po haplotipu i više stope mutacija povećavaju verovatnoću da su "haplotipovi identični po poreklu", a ne "slučajno identični". Ovo je takođe od značaja za forenzičke istrage jer se u slučaju poklapanja Y haplotipova visoke rezolucije između srodnika jedne muške linije istraga može suziti samo na tu liniju [67].

Literatura:

1. Bradbury N. *All Cells Have a Sex: Studies of Sex Chromosome Function at the Cellular Level*. Academic Press, 2017.
2. Rappold GA. The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum Genet* 1993; 92:315–324.
3. Freije D, Helms C, Watson MS, Donis-Keller H. Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres. *Science* 1992; 258:1784–1787.
4. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 2003; 423:825–837.
5. Colaco S, Modi D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2018; 16(1):14.
6. L. Gusmao, M. Brion, I. Gomes, Chapter 30: the human Y chromosome malespecific polymorphisms and forensic genetics, in: M.J. Bogusz (Ed.), *Handbook of Analytical Separations*, Elsevier Science BV, 2008; p. 969–1000.
7. Boattini A, Sarno S, Mazzarisi AM, Viroli C, De Fanti S, Bini C, et al. Estimating Y-Str Mutation Rates and Tmrca Through Deep-Rooting Italian Pedigrees. *Sci Rep* 2019; 9(1):9032.
8. Sullivan K, Mannucci A, Kimpton C.P, Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of an X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques* 1993; 15:636–638. 640–641.
9. Santos FR, Pandya A, Tyler-Smith C. Reliability of DNA-based sex tests. *Nat Genet* 1998; 18(2):103.
10. Butler J. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Academic Press 2011; ISBN: 9780123878236.
11. Casanova M, Leroy P, Boucekkin C, Weissenbach J, Bishop C, Fellous M, et al. A human Y-linked DNA polymorphism and its potential for estimating genetic and evolutionary distance. *Science* 1985; 230:1403–1406.
12. Jobling M. A survey of long-range DNA polymorphisms on the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 1994; 3:107–114.
13. Jobling M, Tyler-Smith C. Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. *Trends Genet* 1995; 11:449–456.
14. Jobling M, Tyler-Smith C. Human Y-chromosome variation in the genome-sequencing era. *Nat Rev Genet* 2017; 18(8):485–497.
15. Köcher S, Müller P, Berger B, Bodner M, Parson W., Roewer, L., et al. DNaseqEx Consortium. Inter-laboratory validation study of the ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit. *Forensic Science International Genetics* 2018; 36:77–85.
16. Goedbloed M, Vermeulen M, Fang RN, Lembring M, Wollstein A, Ballantyne K, et al. Comprehensive mutation analysis of 17 Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms included in the AmpFISTR Yfiler PCR amplification kit. *Int J Legal Med* 2009; 123:471–482.
17. Ballantyne KN, Goedbloed M, Fang R, Schaap O, Lao O, Wollstein A, et al. Mutability of Ychromosomal microsatellites: rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications. *Am J Hum Genet* 2010; 87:341–353.
18. Poznik GD, Henn BM, Yee MC, Sliwerska E, Euskirchen GM, Lin AA, et al. Sequencing Y chromosomes resolves discrepancy in time to common ancestor of males versus females. *Science* 2013; 341:562–565.
19. Poznik GD, Xue Y, Mendez FL, Willems TF, Massaia A, Wilson Sayres MA, et al. Punctuated bursts in human male demography inferred from 1,244 worldwide Y-chromosome sequences. *Nat Genet* 2016; 48:593–599.
20. Helgason A, Einarsson AW, Guðmundsdóttir VB, Sigurðsson Á, Gunnarsdóttir ED, Jagadeesan A, et al. The Y-chromosome point mutation rate in humans. *Nat Genet* 2015; 47:453–457.
21. Fu Q, Li H, Moorjani P, Jay F, Slepchenko SM, Bondarev AA, et al. Genome sequence of a 45,000-year-old modern human from western Siberia. *Nature* 2014; 514:445–449.
22. Jobling M. Y Chromosomal SNP Haplotype Diversity in Forensic Analysis. *Forensic Sci Int* 2001; 118(2-3):158–62.
23. Wetton JH, Tsang KW, Khan H. Inferring the population of origin of DNA evidence within the UK by allele-specific hybridization of Y-SNPs. *Forensic Sci Int* 2005; 152(1):45–53.
24. Phillips C. Forensic genetic analysis of bio-geographical ancestry. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 18:49–65.
25. Jobling M, Tyler-Smith C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat Rev Genet* 2003; 4:598–612.
26. Underhill PA, Kivisild T. Use of y chromosome and mitochondrial DNA population structure in tracing human migrations. *Annu Rev Genet*. 2007; 41:539–64.

27. Cruciani F, Santolamazza P, Shen P, Macaulay V, Moral P, Olckers A, et al. A back migration from Asia to sub-Saharan Africa is supported by high resolution analysis of human Y-chromosome haplotypes. *Am J Hum Genet* 2002; 70:1197–1214.
28. Karafet T, Xu L, Du R, Wang W, Feng S, Wells R, et al. Paternal population history of East Asia: sources, patterns, and microevolutionary processes. *Am J Hum Genet* 2001; 69:615–628.
29. Kayser M, Brauer S, Weiss G, Schiefenho"vel W, Underhill P, Shen P, et al. Reduced Y-chromosome, but not mitochondrial DNA, diversity in human populations from West New Guinea. *Am J Hum Genet* 2003; 72:281–302.
30. Wells R, Yuldasheva N, Ruzibakiev R, Underhill P, Evseeva I, Blue-Smith J, et al. The Eurasian heartland: a continental perspective on Y-chromosome diversity. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98:10244–10249.
31. Zerjal T, Wells R, Yuldasheva N, Ruzibakiev R, Tyler-Smith C. A genetic landscape reshaped by recent events: Y-chromosomal insights into central Asia. *Am J Hum Genet* 2002; 71:466–482.
32. Cruciani F, La Fratta R, Torroni A, Underhill P, Scozzari R. Molecular dissection of the Y chromosome haplogroup E-M78 (E3b1a): a posteriori evaluation of a microsatellite-networkbased approach through six new biallelic markers. *Hum. Mutat* 2006; 27:831–832.
33. Rootsi S, Magri C, Kivisild T, Benuzzi G, Help H, Bermisheva M, et al. Phylogeography of Y-chromosome haplogroup I reveals distinct domains of prehistoric gene flow in Europe. *Am J Hum Genet* 2004; 75:128–137.
34. Balaresque P, Bowden GR, Adams SM, Leung HY, King TE, Rosser ZH, et al. A predominantly neolithic origin for European paternal lineages. *PLoS Biol* 2010; 8(1):e1000285.
35. Underhill P, Poznik G., Rootsi, S. et al. The phylogenetic and geographic structure of Y-chromosome haplogroup R1a. *Eur J Hum Genet* 2015; 23:124–131.
36. Willems T, Gymrek M, Poznik GD, Tyler-Smith C; 1000 Genomes Project Chromosome Y Group, Erlich Y. Population-Scale Sequencing Data Enable Precise Estimates of Y-STR Mutation Rates. *Am J Hum Genet* 2016;98(5):919–933.
37. Bosch E, Calafell F, Santos FR, Pérez-Lezaun A, Comas D, Benchemsi N, et al. Variation in short tandem repeats is deeply structured by genetic background on the human Y chromosome. *Am J Hum Genet* 1999; 65:1623–1638.
38. Athey WT. Haplogroup prediction from Y-STR values using an allele-frequency approach. *J Genet Geneal* 2005; 1:1–7.
39. Athey WT. Haplogroup prediction from Y-STR values using a Bayesian-allele-frequency approach. *J Genet Geneal* 2006; 2:34–39.
40. Schlecht J, Kaplan ME, Barnard K, Karafet T, Hammer MF, Merchant NC. Machine-learning approaches for classifying haplogroup from Y chromosome STR data. *PLoS Comput Biol* 2008; 4:e1000093.
41. Roewer L, Arnemann J, Spurr NK, Grzeschik KH, Epplen JT. Simple repeat sequences on the human Y chromosome are equally polymorphic as their autosomal counterparts. *Hum Genet* 1992; 89:389–94.
42. Roewer L, Epplen J.T. Rapid and sensitive typing of forensic stains by PCR amplification of polymorphic simple repeat sequences in case work. *Forensic Sci Int* 1992; 53:163–171.
43. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ. Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature*. 1985; 318(6046):577-9.
44. Purps J, Geppert M, Nagy M, Roewer L. Validation of a combined autosomal/Y-chromosomal STR approach for analyzing typical biological stains in sexual-assault cases. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 19:238–242.
45. Kayser M, Caglià A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, et al. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study, *Int J Legal Med* 1997; 110(3): 125–133.
46. Kayser, M. Forensic use of Y-chromosome DNA: A general overview. *Hum Genet* 2017; 136(5):621–635.
47. Kayser M, Kittler R, Erler A, Hedman M, Lee AC, Mohyuddin A, et al. A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellites. *Am J Hum Genet* 2004; 74:1183–1197.
48. Ballantyne KN, Goedbloed M, Fang R, Schaap O, Lao O, Wollstein A, et al. Mutability of Y-chromosomal microsatellites: rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications. *Am J Hum Genet* 2010; 87:341–353.
49. Liu H, Li X, Mulero J, Carbonaro A, Short M, Ge J. A convenient guideline to determine if two Y-STR profiles are from the same lineage, *Electrophoresis* 2016; 37(12), pp. 1659–1668.
50. Ballantyne KN, Keerl V, Wollstein A, Choi Y, Zuniga SB, Ralf A, et al. ()'A new future of forensic Y-chromosome analysis: Rapidly mutating Y-STRs for differentiating male relatives and paternal lineages, *Forensic Sci Int Genet* 2012; 6(2):208–218.

51. Adnan A, Ralf A, Rakha A, Kousouri N, Kayser M. Improving empirical evidence on differentiating closely related men with RM Y-STRs: a comprehensive pedigree study from Pakistan. *Forensic Sci Int Genet* 2016; 25:45–51.
52. Alghafri R, Goodwin W, Ralf A, Kayser M, Hadi S. A novel multiplex assay for simultaneously analysing 13 rapidly mutating Y-STRs. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 17:91–98.
53. Boattini A, Sarno S, Bini C, Pesci V, Barbieri C, De Fanti S, et al. Mutation Rates and Discriminating Power for 13 Rapidly-Mutating Y-STRs between Related and Unrelated Individuals. *PLoS One* 2016; 11(11):e0165678.
54. Turrina S, Caratti S, Ferrian M, De Leo D. Are rapidly mutating Y-short tandem repeats useful to resolve a lineage? Expanding mutability data on distant male relationships. *Transfusion* 2016; 56(2):533–8.
55. Robino C, Ralf A, Pasino S, De Marchi MR, Ballantyne KN, Barbaro A, et al. Development of an Italian RM Y-STR haplotype database: Results of the 2013 GEFI collaborative exercise. *Forensic Sci Int Genet*. 2015; 15:56–63.
56. Kecmanović M, Čokić VP, Zgonjanin Bosić D, Jakovski Z, Veljković A, et al. A comprehensive mutation study in wide deep-rooted R1b Serbian pedigree: mutation rates and male relative differentiation capacity of 36 Y-STR markers. *Forensic Sci Int Genet* 2019; 41:137–144.
57. Thompson J, Ewing M, Frank W, Pogemiller J, Nolde C. A., Koehler D, et al. Developmental validation of the PowerPlex® Y23 system: A single multiplex Y-STR analysis system for casework and database samples. *Forensic Sci Int Genet* 2013; 7(2):240–250.
58. Gopinath S, Zhong C, Nguyen V, Ge J, Lagacé R, Short M, et al. Developmental validation of the Yfiler® Plus PCR Amplification Kit: An enhanced Y-STR multiplex for casework and database applications. *Forensic Sci Int Genet* 2016; 24: 164–175.
59. Rakha A, Oh Y, Lee H, Hussain S, Waryah A, Adnan A, et al. Discriminating power of rapidly mutating Y-STRs in deep rooted endogamous pedigrees from Sindhi population of Pakistan, *Leg Med Tokyo* 2018; 34:17–20.
60. Claerhout S, Van der Haegen M, Vangeel L, Larmuseau M, Decorte R. A game of hide and seek: identification of parallel Y-STR evolution in deep-rooting pedigrees, *Eur J Hum Genet* 2019; 27:637–646.
61. Ralf A, Lubach D, Kousouri N, Winkler C, Schulz I, Roewer L, et al. Identification and characterization of novel rapidly mutating Y-chromosomal short tandem repeat markers. *Hum Mutat* 2020; 41(9):1680–1696.
62. Ralf A, Zandstra D, Weiler N, van Ijcken WFJ, Sijen T, Kayser M. RMplex: An efficient method for analyzing 30 Y-STRs with high mutation rates. *Forensic Sci Int Genet* 2021; 55:102595.
63. Oh Y, Lee H, Lee E, Kim E, Yang W, Shin K. Haplotype and mutation analysis for newly suggested Y-STRs in Korean father-son pairs, *Forensic Sci Int Genet* 2015; 15:64–68.
64. Da Fré NN, Rodenbusch R, Gastaldo AZ, Hanson E, Ballantyne J, Alho CS. Genetic data and de novo mutation rates in father-son pairs of 23 Y-STR loci in Southern Brazil population. *Int J Legal Med* 2015; 129(6):1221–3.
65. Petrovic V, Kecmanovic M, Keckarevic Markovic M, Keckarevic D, Assessment of mutation rates for PPY23 Y chromosome STR loci in Serbian father-son pairs, *Forensic Sci Int Genet* 2019; 39:e5–e9.
66. Claerhout S, Vandenbosch M, Nivelte K, Gruyters L, Peeters A, Larmuseau M, et al. Determining Y-STR mutation rates in deep-routing genealogies: identification of haplogroup differences, *Forensic Sci Int Genet* 2018; 34:1–10.
67. Roewer L. Y-chromosome short tandem repeats in forensics—Sexing, profiling, and matching male DNA. *WIREs Forensic Sci*. 2019; 1:e1336.
68. Andersen M, Eriksen P, Morling N. The discrete Laplace exponential family and estimation of Y-STR haplotype frequencies. *J Theor Biol* 2013; 329: 39–51.
69. 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.
70. Millstein R. The concepts of population and metapopulation in evolutionary biology and ecology. In M. A. Bell, D. J. Futuyma, W. F. Eanes, & J. S. Levinton (Eds.), *Evolution since Darwin: The first 150 years*. 2010. Sunderland, MA: Sinauer
71. Willuweit S, Roewer L. The new Y Chromosome Haplotype Reference Database. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 15:43–48.
72. Baker J, Rotimi C, Shriner D. Human ancestry correlates with language and reveals that race is not an objective genomic classifier. *Sci Rep* 2017; 7(1):1572.
73. Quintana-Murci L, Krausz C, Zerjal T, Sayar S, Hammer M, Mehdi S, et al. Y chromosome lineages trace diffusion of people and languages in southwestern Asia. *Am J Hum Genet* 2001; 68(2):537–542.

74. Oota, H., Settheetham-Ishida, W., Tiwawech, D., Ishida, T., & Stoneking, M. (). Human mtDNA and Y-chromosome variation is correlated with matrilineal versus patrilineal residence. *Nat Genet* 2001; 29(1):20–21.
75. Rosser Z, Zerjal T, Hurles M, Adojaan M, Alavantic D, Amorim A, et al. Y-chromosomal diversity in Europe is clinal and influenced primarily by geography, rather than by language. *Am J Hum Genet* 2000; 67(6):1526–1543.





IMPRESUM

Trendovi u molekularnoj biologiji, 2022.

Izdavač

**Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu**

Urednik

Dr **Sonja Pavlović**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Uređivački odbor

Dr **Jelena Begović**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr **Ivana Novaković**, redovni profesor,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr **Dužanka Savić Pavićević**, redovni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Ana Đorđević**, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu Institut za biološka istraživanja
„Siniša Stanković“

Recenzenti

Dr **Svetlana Radović**, redovni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Vesna Škodrić Trifunović**, redovni profesor,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Gordana Nikčević**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Dizajn i izrada korica

Ivan Strahinić

Štampa

Curent Print, Beograd

Periodičnost izlaženja publikacije

Godišnje

Tiraž

100 primeraka

Autori

Aleksandar Cingel.....	238
Ana Branković.....	63
Ana Djordjević.....	63
Branislava Medić Brkić.....	15
Dragana Srebro.....	15
Dunja Drakulić.....	168
Dusan Keckarević.....	51, 275
Goran Brajušković.....	63
Gordana Matić.....	8
Ilona Đorić.....	75
Ivana Guševac Stojanović.....	168
Jelena Martinović.....	186
Jelena Perić.....	143
Jovana Despotović.....	90
Katarina Savić Vujović.....	15
Katarina Zeljić.....	223
Mariana Stanišić.....	255
Marijana B. Živković.....	104
Marina Zarić Kontić.....	186
Milena Trajković.....	238
Milena Ugrin.....	32
Milica Keckarević Marković.....	51, 275
Milica Popović.....	63
Miljana Kecmanović.....	51, 275
Neda Đorđević.....	206
Nevena Banjac.....	223
Nikola Jovanović.....	125
Predrag Vujović.....	155
Sladjana Jevremović.....	238
Slavica Ninković.....	223
Sonja Šelemetjev.....	75
Sonja Vučković.....	15
Suzana Matijašević-Joković.....	63
Tamara Dakić.....	155
Tatjana Mitrović.....	125
Tijana Išić Denčić.....	75
Zorana Dobrijević.....	63

CIP - Каталогизacija u publikaciji
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

577.2

TRENDOVI u molekularnoj biologiji = Trends in
Molecular Biology. - 2022, br. 2 (sep.)- . - Beograd :
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
2021- (Beograd : Curent Print). - 28 cm

Godišnje. - Tekst na srp. i engl. jeziku.
ISSN 2787-2947 = Trendovi u molekularnoj biologiji
COBISS.SR-ID 45105929