

Določitev spola na podlagi spolno dimorfnih amelogeninskih peptidov v človeški zobni sklenini

Marko Fonović¹, Tamara Leskovar², Iztok Štamfelj³

V forenzičnih in antropoloških analizah človeških skeletnih ostankov se za določitev spola uporabljata predvsem vrednotenje spolno dimorfnih osteoloških znakov in analiza molekularnih označevalcev na spolnih kromosomih. Napredek pri proteomski analizi sklenine z masno spektrometrijo je v zadnjih letih omogočil določitev spola na podlagi identifikacije spolno dimorfnih amelogeninskih peptidov. Amelogenine kodirata gena AMELX na kromosomu X in AMELY na kromosomu Y, zato so pri ženski v zobni sklenini amelogeninski peptidi, specifični za kromosom X, (APX), pri moškem pa poleg njih še amelogeninski peptidi, specifični za kromosom Y, (APY). V raziskavi smo uporabili zobe, ki so bili pri stomatološkem zdravljenju odstranjeni trem pacientkam in trem pacientom. Peptide smo ekstrahirali z dvominutnim jedkanjem površine sklenine s klorovodikovo kislino, kar ni opazno spremenilo velikosti in oblike zobnih kron. Produkta jedkanja smo analizirali s tekočinsko kromatografijo in tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Za identifikacijo peptidov smo uporabili programski paket PEAKS in bazo človeških proteinov nrNCBI. Na podlagi identifikacije para peptidov AMELX-(44-50) (SIRPPYP) in AMELY-(58-65) (SMIRPPYS) smo v vseh primerih pravilno določili spol posameznika. Pri moških smo v vzorcih identificirali manj kot 5 APY, ključnih za določitev moškega spola, zato priporočamo uporabo ekstrakcijskih protokolov z daljšim jedkanjem sklenine ali s predhodnim odvzemom kosa sklenine. Dosedanje raziskave, narejene pretežno na zobeh iz arheoloških zbirk, so pokazale, da je proteomska metoda najbolj senzitivna in omogoča določitev spola tudi v primerih, ko ga ni mogoče določiti na podlagi analize osteoloških znakov ali DNK. Nova metoda predstavlja proteomsko različico amelogeninskega testa, s katerim si deli skupno pomanjkljivost – napačno določitev spola pri moških z delecijo AMELY, ker imajo v sklenini izključno APX. Čeprav je delež AMELY-negativnih moških večji od 1 % le pri populacijah na indijski podcelini, težava ni zanemarljiva, saj ima napačna določitev spola lahko resne posledice za potek kriminalistične preiskave. Z validacijo na večjem številu različno ohranjenih recentnih zob in določitvijo najoptimalnejšega laboratorijskega protokola bi se proteomska metoda lahko uveljavila kot dopolnilna metoda za določitev spola v kombinaciji z uveljavljenimi forenzičnimi analizami DNK.

Ključne besede: določitev spola, zobna sklenina, peptidi, amelogenin, LC-MS/MS

UDK: 343.983.2

1 Uvod

V preiskavah kaznivih dejanj in množičnih nesreč preiskovalci neredko obravnavajo človeška trupla in morajo opraviti identifikacijske postopke ter ugotoviti identiteto žrtev (Trapečar, 2017). Če je truplo razpadlo, skeletirano ali zoglenelo, je pogrešano osebo mogoče identificirati z uporabo forenzičnih genetskih preiskav, če je dezoksiribonukleinska kislina (DNK) zadovoljivo ohranjena in so na voljo primerjalni vzorci

(Kastelic in Drobnič, 2012). V primerih, ko eden od pogojev ni izpolnjen, lahko z določitvijo biološkega profila, ki vključuje spol, starost, višino, etnično poreklo, bolezenske spremembe in telesne posebnosti, kriminalistične preiskave usmerimo v zmanjšan krog posameznikov in potencialno identificiramo žrtev (Cattaneo in Baccino, 2002). Število takih forenzičnih primerov bi se pri nas lahko povečalo po eni strani zaradi današnje odprtosti državnih meja in migracijskih pritiskov iz oddaljenih predelov sveta (Kastelic in Drobnič, 2012), po drugi strani zaradi bolj sistematičnega preiskovanja množičnih po-bojev po drugi svetovni vojni (Pahor in Jamnik, 2012).

V forenzični preiskavi je spol ključna sestavina biološkega profila storilca kaznivega dejanja ali pogrešane osebe, pri antropoloških analizah pa omogoča raziskovanje demografskih, socialnih, bolezenskih in drugih razlik med spoloma pri preteklih populacijah (White, Black in Folkens, 2012). V današnjem času se za določitev spola uporabljata predvsem dve metodi: vrednotenje spolno dimorfnih osteoloških znakov,

¹ Dr. Marko Fonović, izredni profesor za biokemijo, Odsek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo, Inštitut Jožef Štefan, Slovenija. E-pošta: marko.fonovic@ijs.si

² Dr. Tamara Leskovar, docentka za arheološko naravoslovje in arheometrijo, Filozofska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija. E-pošta: tamara.leskovar@ff.uni-lj.si

³ Dr. Iztok Štamfelj, docent za zobne bolezni in normalno morfologijo zobnega organa, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija. E-pošta: iztok.stamfelj@mf.uni-lj.si

med katerimi so najzanesljivejši znaki medenice (Buikstra in Ubelaker, 1994; Gonzalez, Bernal in Perez, 2009; Krishan, Chatterjee, Kanchan, Kaur, Baryah in Singh, 2016), ter analiza označevalcev DNK na spolnih kromosomih (Loreille et al., 2018; Stone, Milner, Pääbo in Stoneking, 1996). Prva metoda je hitra, poceni in nedestruktivna, vendar ni uporabna pri skeletnih ostankih otrok in mladostnikov, ker se spolno dimorfni znaki na skeletu začnejo razvijati šele s puberteto (Iscan in Steyn, 2013; Mittler in Sheridan, 1992; Schutkowski, 1993), poleg tega njeno uporabo v praksi pogosto otežuje nepopolna ohranjenost skeleta. Njena zanesljivost je v najboljšem primeru od 80- do 95-odstotna (Cox, 2000; Gaya-Sancho, Alemán Aguilera, Navarro-Muñoz in Botella López, 2018; Gonzalez et al., 2009). Analiza DNK je zanesljivejša ter omogoča določitev spola tudi pri skeletnih ostankih otrok in mladostnikov, vendar je zamudnejša in dražja. Poleg tega je destruktivna ter odvisna od količine in kakovosti ohranjene DNK, kar močno omejuje njeno uporabo zlasti v antropologiji.

Metode DNK za določitev spola temeljijo na pomnoževanju specifičnih tarčnih zaporedij na spolnih kromosomih z verižno polimerazno reakcijo (PCR). V forenzičnih primerih največkrat uporabijo amelogeninski test, pri katerem so molekularni označevalci specifična nukleotidna zaporedja obeh genov za proteine amelogenine (Dash, Rawat in Das, 2020; Kastelic in Drobnič, 2012). Gena se izražata v celicah zobne sklenine (ameloblastih). Ker se njuni nukleotidni zaporedji razlikujeta, so tudi amelogenini spolno dimorfni; ameloblasti najprej izdelajo organski matriks sklenine, v katerem so pri ženski izključno amelogenini, specifični za kromosom X, (APX), pri moškem pa poleg teh še amelogenini, specifični za kromosom Y, (APY) (Gil-Bona in Bidlack, 2020). Dozorevanje sklenine vključuje encimsko cepitev proteinov, zato so v dokončno mineralizirani sklenini prisotni le amelogeninski peptidi. Stewart, Gerlach, Gowland, Gron in Montgomery (2017) so razvili proteomsko metodo za določitev spola, pri kateri jedkamo površino zobne sklenine, iz vzorca s kolonsko kromatografijo ekstrahiramo peptide, nato pa z masno spektrometrijo identificiramo APX oziroma APX in APY.

Čeprav je v večini forenzičnih primerov DNK v posmrtnih ostankih razmeroma dobro ohranjena, ni vedno tako, zlasti v primerih skeletnih najdb (Cunha in Cattaneo, 2006). Izpostavljenost agresivnim tafonomskim okoliščinam, kakršna so temperaturna nihanja, visoka temperatura, delovanje vode in mikroorganizmov, vodi v pospešeno razgradnjo molekul DNK (Lindahl, 1993; Schwark, Heinrich, Preusse-Prange in von Wurmb-Schwark, 2011). Obstaja tudi možnost kontaminacije z eksogeno DNK, še zlasti v primeru slabo ohranjenih posmrtnih ostankov, kar lahko vodi do napačnih zaključkov (Edson in Christensen, 2013; Schwark et al., 2011). Skleninski peptidi so uporabna tarča za analize, ker so

zaradi svoje hidrofobne narave in vezave na apatitne kristale v sklenini obstojnejši od molekul DNK (Demarchi et al., 2016; Wasinger et al., 2019). Poleg tega so sestavina sklenine, ki je najbolj mineralizirano in zato tafonomsko najodpornije tkivo v človeškem telesu. Analize fosilnih najdb kažejo, da imajo v primerljivem okolju peptidi vsaj trikrat daljše preživetje kakor molekule DNK (Demarchi et al., 2016).

Proteomska metoda določanja spola se hitro uveljavlja na področju antropologije in arheologije, kjer so jo uporabili pri analizi odmevnejših arheoloških skeletnih najdb iz antičnega obdobja (Lugli et al., 2019) in bronaste dobe (Rebay-Salisbury et al., 2020). Avtorji čedalje bolj omenjajo možnost uporabe nove metode v forenziki, kar je bila neposredna spodbuda za nastanek tega prispevka. V eksperimentalnem delu smo metodo preizkusili na zobeh, ki so jih odstranili pacientom znane spola, v teoretičnem delu pa smo na podlagi rezultatov in pregleda literature ovrednotili njeno potencialno uporabnost za forenzične preiskave.

2 Materiali in metode

2.1 Zobje

Iz zbirke zob na Katedri za zobne bolezni in normalno morfologijo zobnega organa Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani smo vzeli šest stalnih zob, ki so pripadali trem ženskam in trem moškim. Ženskam so pripadali levi spodnji podočnik (zob 33), desni spodnji drugi ličnik (zob 45) in desni spodnji prvi kočnik (zob 46), moškim pa levi spodnji drugi ličnik (zob 35), desni zgornji drugi kočnik (zob 17) in desni spodnji tretji kočnik (zob 48). V oklepajih so zobje zapisani po zapisu FDI (Fédération Dentaire Internationale). Zobe so pacientom odstranili pred približno 15 leti, spol pa so po posegu zabeležili lečeči zobozdravniki. Po odstranitvi smo jih en teden namakali v 5-odstotni raztopini natrijevega hipoklorita, nato smo jih očistili z ročnimi instrumenti, sprali pod tekočo vodo, osušili in uvrstili v zobno zbirko, kjer so bili hranjeni na suhem, pri sobni temperaturi.

2.2 Jedkanje sklenine in ekstrakcija peptidov

Vzorci za analizo smo pripravili v skladu z objavljeno metodo (Stewart et al., 2017). Zobe smo očistili s 3-odstotno raztopino vodikovega peroksida, nato pa sprali z ultra čisto vodo (Honeywell Chromasolv, ZDA). Del zobne sklenine smo dve minuti jedkali v 100 µl 5-odstotne klorovodikove kisline. Raztopino smo zavrgli, nato pa isti del sklenine ponovno dve minuti jedkali s 100 µl sveže 5-odstotne klorovodikove kisline. Raztopino smo nanесли na kolono z nosilcem

C18 (Empore Supelco, ZDA), na katerega so se vezali peptidi, ki so se sprostili iz sklenine. Nosilec C18 smo dvakrat sprali s 50 µl 0,1-odstotne mravljinčne kisline, potem pa smo peptide iz nosilca eluirali z dodatkom dvakrat po 50 µl elucijske raztopine (60-odstotni acetonitril in 0,1-odstotna mravljinčna kislina). Eluat smo z vakuumskim odparevanjem zgostili na 15 µl ter uporabili za analizo s tekočinsko kromatografijo in tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS).

2.3 Analiza z LC-MS/MS

Analizo smo izvedli z enoto EASY-nanoLCII HPLC (Proxeon, ZDA), ki je bila sklopljena z masnim spektrometrom LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, ZDA). Vzorec smo nanесли na predkolono C18 (Proxeon EASY-Column, 2 cm, ID 100 µm, 5 µm, 120 Å, C18-A1), vezane peptide pa smo med seboj ločili na analitski koloni C18 PicoFrit AQUASIL (New Objective, ZDA). Za elucijo peptidov smo uporabili 90-minutni linearni gradient s 5–50 % faze B (100-odstotni acetonitril in 0,1-odstotna mravljinčna kislina) pri stalnem pretoku 300 nl/min. Spektre MS/MS smo dobili s fragmentacijo HCD devetih najintenzivnejših prekurzorskih ionov v posameznem masnospektrometričnem ciklu.

2.4 Identifikacija peptidov in določitev spola

Identifikacijo peptidov smo izvedli s programskim paketom PEAKS (Bioinformatics Solutions, ZDA) in bazo človeških proteinov nrNCBI. Za statistično oceno deleža nepravilnih identifikacij peptidov smo opravili tudi iskanje po bazi proteinov nrNCBI z randomiziranimi aminokislinskimi zaporedji. Kot iskalni parameter smo uporabili nespecifično proteolizo peptidov, oksidacija metioninov in acetilacija N-terminalnih aminokislin pa sta bili nastavljeni kot variabilni modifikaciji peptidov. Statistično verjetnost pravilne identifikacije peptida smo izrazili z negativnim desetiškim algoritmom vrednosti P (–10 lgP). Na podlagi rezultatov iskanj po običajni in randomizirani bazi podatkov je bila vrednost izraza –10 lgP, pri kateri je verjetnost napačne identifikacije (FDR) manjša od 1 %, določena za vsako analizo posebej. V večini primerov je vrednost izraza –10 lgP več kot 30 zagotavljala primerno zanesljivost identifikacije.

Za določitev spola smo tako kot Stewart et al. (2017) uporabili spolno dvoičen amelogeninski peptid, pri katerem se izooblika S-IRPPYPSYG, specifična za kromosom X, razlikuje od izooblike SMIRPPYSSYG, specifične za kromosom Y, po odsotnosti metionina (M) na 45. mestu in zamenjavi prolina (P) s serinom (S) na 50. mestu (slika 1).

SP Q99217 AMELX_HUMAN	MGTWILFACLLGAAFAMLPHPGHPGYINFSYE-----VLTPLKWKYQ	43
SP Q99218 AMELY_HUMAN	MGTWILFACLVGAAAFAMLPHPGHPGYINFSYENSHSQAINVDRIALVLTPLKWKYQ	57
SP Q99217 AMELX_HUMAN	S-IRPPYPSYGYEPMGGWLHHQIIPVLSQQHPPTHTLQPHHHIPVVAQQPVIPQQPMPM	102
SP Q99218 AMELY_HUMAN	SMIRPPYSSYGYEPMGGWLHHQIIPVVSQQHPLTHTLQSHHHIPVVAQQPVRVQQALMP	117
SP Q99217 AMELX_HUMAN	VPGQHSMTPIQHHQPNLPPAQQPYQPVPQPHQPMQPPVHPMQPLPPQPPLPPMF	162
SP Q99218 AMELY_HUMAN	VPGQQSMTPTQHHQPNLPLPAQQPFQPVQPHQPMQPPVQPMQPLLPQPPLPPMF	177
SP Q99217 AMELX_HUMAN	PMQPLPMLPDLTLEAWPSTDKTKREEVD	191
SP Q99218 AMELY_HUMAN	PLRPLPILPDLHLEAWPATDKTKQEEVD	206

Slika 1: Primerjava aminokislinskih zaporedij izooblike amelogenina X in Y (oznaki UniProtKB Q99217-1 in Q99218-2). Neidentične aminokislinske so označene s krepko pisavo, aminokislinsko zaporedje para peptidov, ki smo ga uporabili pri določanju spola, pa je obarvano sivo.

3 Rezultati

Masnospektrometrična analiza je v sklenini izbranih zob identificirala predvsem peptide amelogenina, ameloblastina in enamelina, ki so predstavljali od 55,6 % do 93,4 % vseh peptidov, identificiranih v posameznih vzorcih (tabela 1).

spektra peptidov SIRPPYPSYGYEPM (APX, 828,8903 m/z) in SMIRPPYSSYG (APY, 629,3005 m/z), ki sta bila identificirana v sklenini zoba 35 (slika 2). Pri moških je število identificiranih APX od 3,3- do 6,5-krat presegalo število APY (tabela 2). Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da so zobje 45, 46 in 33 pripadali ženskam, zobje 48, 35 in 17 pa moškim,

Tabela 1: Število (n) in odstotek (%) peptidov, identificiranih v sklenini izbranih stalnih zob

Peptidi	Zobje žensk						Zobje moških					
	33		46		45		35		48		17	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Amelogeninski	83	45,6	87	42,4	80	41,2	88	41,1	58	29,6	47	30,1
Ameloblastinski	29	15,9	32	15,6	31	16,0	40	18,7	19	9,7	31	19,9
Enamelinski	58	31,9	59	28,8	48	24,7	70	32,7	32	16,3	16	10,3
Drugi	12	6,6	27	13,2	35	18,0	16	7,5	87	44,4	62	39,7
Skupaj	182	100,0	205	100,0	194	100,0	214	100,0	196	100,0	156	100,0

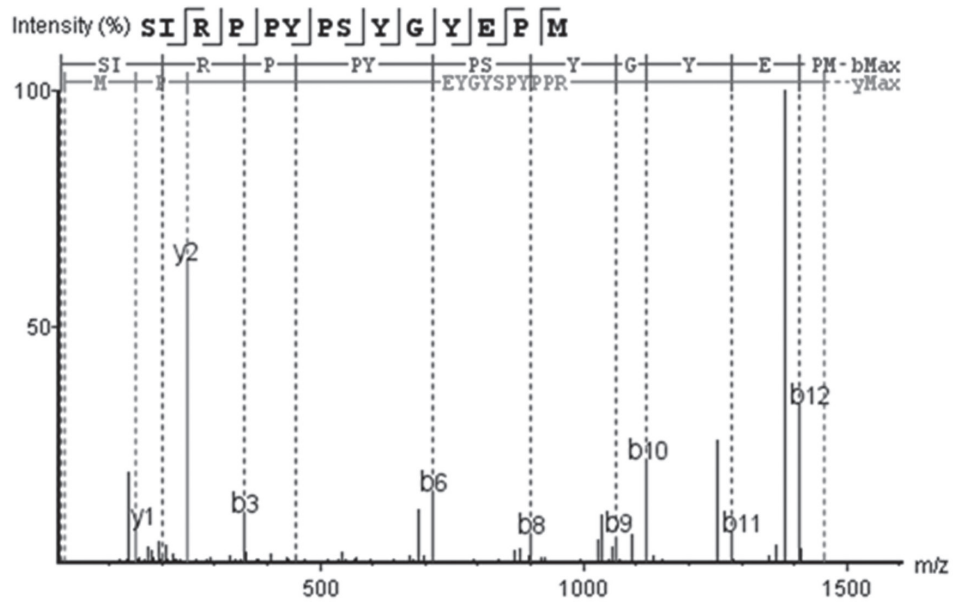
V vzorcih sklenine zob 45, 46 in 33 smo identificirali izključno APX, v vzorcih sklenine zob 48, 35 in 17 pa tako APX kot APY (tabela 2). Kot primer prikazujemo fragmentacijska

kar se ujema s podatki o spolu, ki so jih ob ekstrakcijah zob zabeležili zobozdravniki.

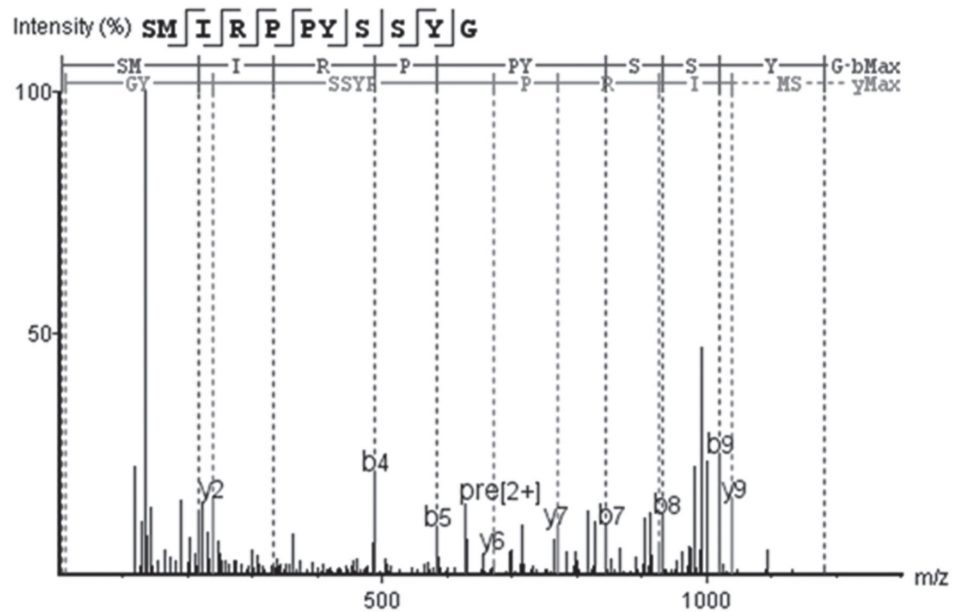
Tabela 2: Število amelogeninskih peptidov, specifičnih za kromosoma X in Y, ter spolno nespecifičnih amelogeninskih peptidov, identificiranih v vzorcih sklenine stalnih zob

Amelogeninski peptidi	Zobje žensk				Zobje moških			Skupaj
	33	46	45	35	48	17		
Specifični za kromosom X	12	15	15	10	13	14	79	
Specifični za kromosom Y	0	0	0	3	2	4	9	
Spolno nespecifični	71	72	65	75	43	29	355	
Skupaj	83	87	80	88	58	47	443	

Marko Fonović, Tamara Leskovar, Iztok Štamfelj: Določitev spola na podlagi spolno dimorfnih amelogeninskih peptidov v človeški zobni sklenini



A



B

Slika 2: Fragmentacijski spekter MS/MS amelogeninskega peptida SIRPPYPSYGYEPM, specifičnega za kromosom X, (A) ter amelogeninskega peptida SMIRPPYSSYG, specifičnega za kromosom Y, (B) iz sklenine levega spodnjega drugega ličnika (zob 35), ki so ga odstranili pacientu moškega spola.

Spolno dimorfni amelogeninski peptidi so bili glede na vrednost izraza $-10 \lg P$ identificirani z vsaj 99-odstotno verjetnostjo; izjema je bil peptid SMIRPPY, ekstrahiran iz sklenine desnega zgornjega drugega kočnika (zob 17), ki je bil zaradi krajšega aminokislinskega zaporedja identificiran s 95-odstotno verjetnostjo (tabela 3). Edina ugotovljena kemična modifikacija aminokislina je bila oksidacija metionina v peptidu SM_{ox}IRPPYSSYG, ki je bil ekstrahiran iz sklenine levega spodnjega drugega ličnika (zob 35).

ciranih skleninskih peptidov pripadala amelogeninom ter neamelogeninoma ameloblastinu in enamelinu, ki spadajo med proteine, najbolj zastopane v organskem matriksu sklenine (Castiblanco, Rutishauser, Ilag, Martignon, Castellanos in Mejia, 2015). Organski matriks sklenine vsebuje kar 25–30 % proteinov; 90–95 % je amelogeninov in 10–15 % neamelogeninov (Berkovitz, Holland in Moxham, 2017). Amelogenini imajo razmeroma majhno molekulsko maso (< 31 kDa), poleg tega vsebujejo veliko prolina (25–30 %), pa tudi histidi-

Tabela 3: Identifikacija spolno dimorfnih amelogeninskih peptidov v skleninskih vzorcih izbranih stalnih zob

Zob (FDI-zapis)	Aminokislinsko zaporedje peptida	Izo-oblika	$-10 \lg P$	Masa peptida (Da)	m/z	Napaka mase (ppm)
45	SIRPPYPSYGYEPMGGW	X	60,65	1955,8876	978,9522	3,7
46	SIRPPYPSYGYEPMGGWLH	X	70,32	2206,0305	736,3494	1,0
33	SIRPPYPSYGYEPMGGWLHH	X	64,37	2343,0894	782,0355	1,1
48	SIRPPYPSYGYEPMGGW	X	55,05	1955,8876	978,9508	2,3
	SM _{ox} IRPPYSSY	Y	39,51	1215,5593	608,7860	1,1
35	SIRPPYPSYGYEPM	X	55,19	1655,7654	828,8903	2,9
	SMIRPPYSSYG	Y	48,17	1256,5859	629,3005	3,0
17	SIRPPYPSYGYEPMGGW	X	51,71	1955,8876	978,9474	-1,0
	SMIRPPY	Y	27,94	862,4371	432,2252	1,3

Legenda: $-10 \lg P$ – statistična zanesljivost identifikacije peptida; m/z – razmerje molekulske mase in naboja.

4 Razprava

V raziskavi smo uporabili zobe, ki so jih pri stomatološkem zdravljenju odstranili trem pacientkam in trem pacientom. Na podlagi masnospektrometrične analize amelogeninskih peptidov iz zobne sklenine smo spol pravilno določili v vseh šestih primerih. Površino sklenine smo jedkali dvakrat po dve minuti s klorovodikovo kislino, v analizi pa smo uporabili produkte drugega jedkanja. Pri tem postopku se oblika in velikost zobnih kron nista opazno spremenili, kar je velika prednost te metode pred določanjem spola na podlagi DNK, ki je zaradi destruktivne narave manj primerno predvsem za analize dragocenih arheoloških skeletnih najdb. Poleg tega nova metoda ni zamudna, saj smo lahko analizo vseh vzorcev izvedli v enem dnevu.

Tako kot v prejšnjih raziskavah (Lugli et al., 2019; Rebay-Salisbury et al., 2020; Stewart et al., 2017; Ziganshin, Berezina, Alexandrov, Ryabinin in Buzhilova, 2020) je glavnina identifi-

na, glutamina in levcina, ter so zato hidrofobni; nasprotju s tem so neamelogenini kisli, glikozilirani fosfoproteini z večjo molekulsko maso (> 71 kDa) (Črešnar, Plemenitaš in Žakelj-Mavrič, 2002). Med razvojem sklenine izdelavi organskega matriksa takoj sledi mineralizacija. Razmere zanjo ustvarijo ameloblasti, ki iz matriksa odstranijo večino vode, dovajajo pa mineralizacijske ione in encime proteaze. Proteaze še pred končanjem mineralizacije razgradijo večino matriksnih proteinov, zato so v zreli sklenini le njihovi peptidni fragmenti (Castiblanco et al., 2015).

Metoda, ki smo jo preizkusili, je pravzaprav proteomska različica v uvodu omenjenega amelogeninskega testa, ki se za določanje spola že desetletja uporablja v forenzičnih preiskavah, pri presejanju genskih bank in v prenatalni diagnostiki. Človek ima tako kot nekateri drugi sesalci dva amelogeninska gena; oba sta locirana na spolnih kromosomih, eden na distalnem delu kratke ročice kromosoma X (AMELX, Xp22,1-p22,3), drugi pa v pericentromeričnem predelu kro-

mosoma Y (AMELY, Yq11) (Lau, Mohandas, Shapiro, Slavkin in Snead, 1989). Z alternativnim izrezovanjem primarnih prepisov obeh amelogeninskih genov nastanejo tri izooblike amelogenina X (oznake UniProtKB Q99217-1, Q99217-2 in Q99217-3) in dve izoobliki amelogenina Y (oznaki UniProtKB Q99218-1 in Q99218-2). Primerjava aminokislinskih zaporedij amelogenina X (Q99217-3) in amelogenina Y (Q99218-2) pokaže 20 razlik, ki so precej enakomerno razporejene vzdolž zapisa (slika 1).

Za določitev spola smo uporabili isti par peptidov kakor Stewart et al. (2017) in za njim Lugli et al. (2019) ter Rebay-Salisbury et al. (2020), in sicer AMELY-(58-65) (SMIRPPYS), ki se od AMELX-(44-50) (SIRPPYP) razlikuje po dodatnem metioninu in zamenjavi enega prolina s serinom (slika 1). Izbrani APX je sestavina vseh treh izooblik amelogenina X, njegov kromosomski analog pa sestavina obeh izooblik amelogenina Y. Poleg tega je bil peptid z oksidiranim metioninom SM_{ox}IRPPYS edini APY, ki so ga identificirali v sklenini prav vseh moških skeletov iz arheoloških zbirk (Ziganshin et al., 2020). Ne nazadnje se izbrani peptidni par zaradi specifične porazdelitve naboja zelo dobro identificira z masno spektrometrijo. Nekateri avtorji so ubrali bolj destruktiven pristop, pri katerem so vzorce sklenine izrezali z diamantnim zobozdravniškim svedrom in jih med demineralizacijo zdrobili, spol pa so določili na podlagi vseh masnospektrometrično identificiranih spolno dimorfnih zaporedij amelogeninskih peptidov (Buonasera et al., 2020; Parker et al., 2019).

Stewart et al. (2017) so menili, da je pri analizi produktov kislinskega jedkanja sklenine identifikacija APX in APY zanesljiv pokazatelj moškega spola, identifikacija izključno APX pa zanesljiv pokazatelj ženskega spola. Parker et al. (2019) so pozneje ugotovili, da drži le prva trditev, druga pa ne, ker bi bila pri nekaterih moških koncentracija APY v vzorcu lahko pod mejo detekcije. To je posledica kombinacije endogenih (bioloških) in eksogenih (okoljskih) dejavnikov. Na prvem mestu je večja transkripcijska aktivnost AMELX v primerjavi z AMELY, ki zagotavlja pri moškem le 10 % vseh amelogeninskih prepisov (Sasaki in Shimokawa, 1995). Skladno s tem smo pri moških v vzorcih sklenine identificirali nekajkrat več APX kakor APY (tabela 2). Poleg tega k zmanjšanju količine APY v sklenini arheoloških in nekaterih forenzičnih skeletnih najdb lahko prispevajo neugodne tafonomske okoliščine (Parker et al., 2019).

Parker et al. (2019) so z logistično regresijo izdelali verjetnostno krivuljo, temelječo na predpostavki, da se z večanjem signala APX povečuje verjetnost ženskega spola, in za vsako določitev ženskega spola izračunali statistično verjetnost ocene. Z analizo so zajeli 8 recentnih posameznikov in 17 skeletov iz arheoloških zbirk, pri katerih je bil spol predhodno

določen na podlagi analize osteoloških znakov ali DNK. S proteomsko metodo določene ocene ženskega spola so imele verjetnost med 72 in 97 %. Drugače so k reševanju omenjene težave pristopili Ziganshin et al. (2020), ki so od dva- do trikratno povečanje števila identificiranih amelogeninskih peptidov dosegli s podaljšanjem jedkanja sklenine na 10 minut. V raziskavi zob iz arheoloških zbirk so empirično dokazali, da lahko spol zanesljivo določimo na podlagi prisotnosti ali odsotnosti APY, če v vzorcu ne identificiramo manj kot 30 APX. Pri dveh srednjeveških skeletih otrok so po 4 minutah jedkanja sklenine v vzorcu identificirali le APX, po 10 minutah jedkanja sklenine pa tudi APY, pri tem pa se je število identificiranih APX z 9 oziroma 17 povečalo na 49 oziroma 45. Tudi rezultati naše raziskave so v prid daljšega jedkanja sklenine; po drugem dvominutnem jedkanju smo v vzorcih identificirali 10-15 APX, kar je približno polovica priporočene vrednosti, pri moških pa še 2-4 APY. Tako majhno število identificiranih APY verjetno ne zagotavlja zanesljivosti pri identifikaciji moškega spola v forenziki in antropologiji, kjer ne moremo zanemariti učinkov proteolitične razgradnje zaradi procesov diagenoze (Froment et al., 2020). Ključ do rešitve težave je v izboljšanju ekstrakcije peptidov, ki ga lahko dosežemo z daljšim jedkanjem površine sklenine (Ziganshin et al., 2020) ali koščka odstranjene sklenine s klorovodikovo kislino (Lugli et al., 2019; Parker et al., 2019) ali z uprašitvijo zoba in njegovo demineralizacijo z etilendiamintetraocetno kislino (EDTA) (Froment et al., 2020).

Poleg tega obstaja še vprašanje napačne določitve spola pri moških, ki imajo zaradi delecije gena AMELY v sklenini izključno APX. Gre za genetski polimorfizem brez znanih škodljivih posledic za fenotip in reprodukcijsko sposobnost posameznika (Lattanzi et al., 2005; Mitchell, Kreskas, Baxter, Buffalino in Van Oorschot, 2006). Delež moških z delecijo AMELY je v večini populacij manjši od 1 %, v nekaterih populacijah na indijski podcelini pa se celo približa 10 % (tabela 4). Čeprav je delež AMELY-negativnih moških v večini populacij zelo majhen, težava ni zanemarljiva, saj lahko napačna določitev spola spremeni potek kriminalistične preiskave in njene pravne posledice. O tem vprašanju se je v forenzični literaturi precej pisalo v zvezi z amelogeninskim testom, ki je sestavina skoraj vseh na tržišču prisotnih setov za tipizacijo DNK (Westen, Kraaijenbrink, Robles de Medina, Harteveld, Willemse, Zuniga et al., 2014). Opisan je bil tudi primer napačne določitve spola z amelogeninskim testom pri AMELY-negativnem moškem iz Slovenije (Drobnič, 2006). Avtorji priporočajo uporabo amelogeninskega testa le skupaj z genetskimi označevalci kromosoma Y, lociranimi zunaj regije AMELY (npr. STS, SRY, TSPY, DXYS156, DYZ1, SNP) (Dash et al., 2020). S tem namenom je Drobnič (2006) razvila označevalec lokusa SRY, ki se lahko uporablja skupaj z multipleks PCR označevalci ter ima visoko senzitivnost in zanesljivost

pri določanju spola (Kastelic, Budowle in Drobnič, 2009). Pri proteomski različici amelogeninskega testa take varovalke nimamo na razpolago, ker so vsi neamelogenini kodirani na avtosomih. Z možnostjo napačne določitve spola zaradi delecije AMELY je treba računati tudi pri analizah skeletov iz arheoloških najdišč, saj so na podlagi mikrosatelitne variabilnosti kromosomov starost delecije ocenili na več tisoč let (Cadenas et al., 2007; Yong, Gan, Chang in Yap, 2007).

Proteomska metoda določitve spola je bila ob upoštevanju naše raziskave preizkušena na 40 recentnih posameznikov

znanega spola in na skeletnih ostankih 114 posameznikov iz arheoloških zbirk, pri katerih je bil spol predhodno določen na podlagi nagrobnega zapisa, genomske analize, osteološke analize ali arheoloških pokazateljev (tabela 5). Določitev spola na podlagi analize amelogeninskih peptidov v sklenini je bila pravilna pri vseh recentnih posameznikih, pri arheološkem gradivu so ugotovili dve razhajnji (tabela 5). Pri skeletu iz antičnega obdobja (CM-12.2), ki je bil osteološko opredeljen kot ženski, so v sklenini identificirali APY (Lugli et al., 2019), pri skeletu iz predzgodovinskega obdobja (SMP-12), ki je bil na podlagi znakov na lobanji opredeljen kot moški, pa so v

Tabela 4: Populacije, razvrščene po padajoči pogostnosti moških z delecijo gena AMELY

Populacija	Velikost vzorca	Št. moških z delecijo AMELY	% moških z delecijo AMELY	Reference
šrilanška	24	2	8,333	Santos, Pandya in Tyler-Smith (1998)
nepalska	77	5	6,494	Cadenas et al. (2007)
malezijskoindijska	315	10	3,175	Chang, Perumal, Keat, Yong, Kuehn in Burgoyne (2007)
indijska	270	5	1,852	Thangaraj, Reddy in Singh (2002)
singapurskoindijska	175	3	1,714	Yong et al. (2007)
izraelska	96	1	1,042	Michael in Brauner (2004)
malezjskomalajska	334	2	0,599	Chang et al. (2007)
singapurskomalajska	182	1	0,549	Yong et al. (2007)
indijska	4.257	10	0,235	Kashyap, Sahoo, Sitalaximi in Trivedi (2006)
japonska	500	1	0,200	Takayama et al. (2009)
španska	768	1	0,130	Bosch et al. (2002)
južnokitajska	8.087	3	0,037	Ou et al. (2012)
južnokitajska	12.891	3	0,023	Chen, Wu, Cheng, Zhang, Chen in Sun (2014)
avstralska (mešana)	109.000	22	0,020	Mitchell et al. (2006)
kitajska	10.526	2	0,019	Xie et al. (2014)
severnokitajska	79.304	15	0,019	Ma et al. (2012)
avstrijska (kavkazijska)	28.182	5	0,018	Steinlechner, Berger, Niederstatter in Parson (2002)
italijanska	13.000	1	0,008	Lattanzi et al. (2005)
malezjskokitajska	331	0	0,000	Chang et al. (2007)
singapurskokitajska	210	0	0,000	Yong et al. (2007)
slovenska	8.300	1	0,000	Kastelic et al. (2009)

sklenini identificirali samo APX in s 96-odstotno verjetnostjo določili, da je spol ženski (Parker et al., 2019). Razhajanja bi lahko bili posledica napačne določitve spola na podlagi osteoloških meril, v drugem primeru pa morda delecije AMELY, kar bi lahko potrdili ali ovrgli z analizo DNK. V nedavni raziskavi so Buonasera et al. (2020) primerjali rezultate osteološke (vrednotenje 20 spolno dimorfnih znakov na skeletu), proteomske in dveh genomskih metod (R_x in R_y) določanja spola na arheoloških skeletnih ostankih 55 odraslih posameznikov. Proteomska metoda je bila najbolj senzitivna, saj je bila edina, s katero so lahko spol določili pri vseh 55 posameznikih. Pri vzorcih, pri katerih je skupno število odčitkov DNK presegalo 100.000, niso ugotovili razhajanj med proteomsko in genomskima metodama, vendar pa je bila DNK tako dobro ohranjena v manj kot polovici primerov (tabela 5). Rezultati

proteomske in osteološke metode so se ujemale tudi pri vseh posameznikih z dobro izraženimi in ohranjenimi spolno dimorfnimi znaki na skeletu, vendar je bilo takih manj kot tretjina. Pri skeletnih ostankih s slabše ohranjeno DNA ali slabše izraženimi ali ohranjenimi spolno dimorfnimi morfološki znaki se je proteomska ocena spola v posameznih primerih razlikovala od genomске oziroma osteološke. Vendar pa v raziskavi niso ugotovili korelacije med amelogeninskim in DNK signalom, kar pomeni, da je lahko v vzorcu z dobro ohranjenimi amelogeninskimi peptidi DNK slabo ohranjena ali obratno. Zato bi se na področju forenzičnih preiskav proteomska metoda določanja spola lahko uveljavila predvsem kot dopolnilna metoda v kombinaciji z uveljavljenimi analizami DNK.

Tabela 5: Primerjava določitve spola na podlagi amelogeninskih peptidov v sklenini (proteomska metoda) z drugimi metodami

Reference	Št. recentnih posameznikov		Št. preteklih posameznikov, predhodna določitev spola na osnovi						Skupaj
			nagrobnege napisa in osteološke analize		DNK		osteološke analize in/ali arheoloških pokazateljev		
	U	N	U	N	U	N	U	N	
Stewart et al. (2017)	0	0	7	0	0	0	6	0	13
Parker et al. (2019)	8	0	0	0	2	0	10	1 ^a	21
Lugli et al. (2019)	2	0	0	0	0	0	11	1 ^b	14
Wasinger et al. (2019)	4	0	0	0	0	0	0	0	4
Ziganshin et al. (2020)	1	0	0	0	1	0	8	0	10
Froment et al. (2020)	2	0	0	0	11	0	0	0	13
Buonasera et al. (2020)	0	0	0	0	21 ^c	0	15 ^c	0	55
Rebay-Salisbury et al. (2020)	17	0	0	0	0	0	1	0	18
Fonovič et al. (2021)	6	0	0	0	0	0	0	0	6
Skupaj	40	0	7	0	35	0	43	2	154

Legenda: U/N – ujemanje/neujemanje s proteomsko metodo določitve spola; ^a – moški spol, določen na podlagi znakov na lobanji, ženski spol, določen na podlagi analize amelogeninskih peptidov; ^b – ženski spol, določen na podlagi znakov na medenici in lobanji, moški spol, določen na podlagi analize amelogeninskih peptidov; ^c – izključno posamezniki z zanesljivo določenim spolom na podlagi analize osteoloških znakov ali dveh genomskih metod (skupno število odčitkov DNK > 100.000).

5 Zaključki

V eksperimentalnem delu smo preizkusili novo metodo določitve spola, ki temelji na proteomski analizi peptidov v zobni sklenini. Metoda vključuje ekstrakcijo skleninskih peptidov s površinskim jedkanjem sklenine, analizo nastalih produktov s tekočinsko kromatografijo in tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) ter bioinformacijsko obdelavo fragmentacijskih spektrov. Na podlagi identifikacije para peptidov AMELX-(44-50) (SIRPPYP) in AMELY-(58-65) (SMIRPPYS) smo v vseh šestih primerih pravilno določili spol posameznika. Naše izkušnje kažejo, da je metoda nedestruktivna in hitra. Peptide smo ekstrahirali s kratkotrajnim jedkanjem površine sklenine, njihova analiza pa je bila narejena v istem dnevu. Pregled literature pokaže, da so metodo preizkušali predvsem na zobeh iz arheoloških zbirk, pri katerih je bil spol predhodno določen na podlagi analize spolno dimorfni osteoloških znakov ali DNK, uporabljena metodika pa je bila zelo raznolika. To kaže na nujnost vključitve večjega števila zob recentnih posameznikov znanega spola in določitve najoptimalnejšega laboratorijskega protokola. S forenzičnega vidika bi bilo smiselno določiti uporabnost metode pri zobeh, izpostavljenih ekstremnim zunanjim vplivom, na primer visoki temperaturi. Dosedanje raziskave na arheološkem materialu kažejo, da je nova metoda zelo senzitivna in omogoča določitev spola tudi kadar je DNK slabo ohranjena, ima pa isto pomanjkljivost kakor dobro znani amelogeninski PCR test. Oba napačno določita spol pri moških z delecijo gena AMELY, zato bodo pri analizi skeletnih najdb vsaj na področju medicinske forenzike obdržali primat novejši testi DNK, ki vsebujejo različne označevalce za določitev spola zunaj amelogeninske regije. Proteomski pristop bi se na področju forenzičnih preiskav lahko uveljavil predvsem kot dopolnilna metoda za določitev spola v kombinaciji z uveljavljenimi analizami DNK.

Literatura

- Berkovitz, B. K., Holland, G. R. in Moxham, B. J. (2017). *Oral anatomy, histology and embryology* (5th ed.). Edinburgh: Elsevier.
- Bosch, E., Lee, A. C., Calafell, F., Arroyo, E., Henneman, P., de Knijff, P. et al. (2002). High resolution Y chromosome typing: 19 STRs amplified in three multiplex reactions. *Forensic Science International*, 125(1), 42–51.
- Buikstra, J. E. in Ubelaker, D. H. (1994). Standards for data collection from human skeletal remains. Arkansas Archeological Survey Research Series. *Fayetteville: Arkansas Archaeological Survey*.
- Buonasera, T., Eerkens, J., de Flamingh, A., Engbring, L., Yip, J., Li, H. et al. (2020). A comparison of proteomic, genomic, and osteological methods of archaeological sex estimation. *Scientific Reports*, 10(1), 11897.
- Cadenas, A. M., Regueiro, M., Gayden, T., Singh, N., Zhivotovsky, L. A., Underhill, P. A. et al. (2007). Male amelogenin dropouts: Phylogenetic context, origins and implications. *Forensic Science International*, 166(2-3), 155–163.
- Castiblanco, G. A., Rutishauser, D., Ilag, L. L., Martignon, S., Castellanos, J. E. in Mejia, W. (2015). Identification of proteins from human permanent erupted enamel. *European Journal of Oral Science*, 123(6), 390–395.
- Cattaneo, C. in Baccino, E. (2002). A call for forensic anthropology in Europe. *International Journal of Legal Medicine*, 116(6), N1-N2.
- Chang, Y. M., Perumal, R., Keat, P. Y., Yong, R. Y., Kuehn, D. L. in Burgoyne, L. (2007). A distinct Y-STR haplotype for Amelogenin negative males characterized by a large Y(p)11.2 (DYS458-MSY1-AMEL-Y) deletion. *Forensic Science International*, 166(2-3), 115–120.
- Chen, W., Wu, W., Cheng, J., Zhang, Y., Chen, Y. in Sun, H. (2014). Detection of the deletion on Yp11.2 in a Chinese population. *Forensic Science International*. *Genetics*, 8(1), 73–79.
- Cox, M. (2000). Ageing adults from the skeleton. V M. Cox in S. Mays (ur.), *Human osteology in archaeology and forensic science* (str. 61–82). London: Greenwich Medical Media.
- Cunha, E. in Cattaneo, C. (2006). Forensic anthropology and forensic pathology. V A. Schmitt, E. Cunha in J. Pinheiro (ur.), *Forensic anthropology and medicine* (str. 39–53). New Jersey: Humana Press.
- Črešnar, B., Plemenitaš, A. in Žakelj-Mavrič, M. (2002). *Biokemija ustne votline: dopolnilni učbenik biokemije za študente stomatologije*. Ljubljana: Študentska založba.
- Dash, H. R., Rawat, N. in Das, S. (2020). Alternatives to amelogenin markers for sex determination in humans and their forensic relevance. *Molecular Biology Reports*, 47(3), 2347–2360.
- Demarchi, B., Hall, S., Roncal-Herrero, T., Freeman, C. L., Woolley, J., Crisp, M. K. et al. (2016). Protein sequences bound to mineral surfaces persist into deep time. *Elife*, 5. Pridobljeno na <https://elifesciences.org/articles/17092>
- Drobnič, K. (2006). A new primer set in a SRY gene for sex identification. *International Congress Series*, 1288, 268–270.
- Edson, S. M. in Christensen, A. F. (2013). Field contamination of skeletonized human remains with exogenous DNA. *Journal of Forensic Science*, 58(1), 206–209.
- Froment, C., Hourset, M., Saenz-Oyhereguy, N., Mouton-Barbosa, E., Willmann, C., Zanolli, C. et al. (2020). Analysis of 5000 year-old human teeth using optimized large-scale and targeted proteomics approaches for detection of sex-specific peptides. *Journal of Proteomics*, 211, 103548.
- Gaya-Sancho, B., Alemán Aguilera, I., Navarro-Muñoz, J. J. in Botella López, M. (2018). Sex determination in a Spanish population based on sacrum. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 60, 45–49.
- Gil-Bona, A. in Bidlack, F. B. (2020). Tooth Enamel and its Dynamic Protein Matrix. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12).
- Gonzalez, P. N., Bernal, V. in Perez, S. I. (2009). Geometric morphometric approach to sex estimation of human pelvis. *Forensic Science International*, 189(1-3), 68–74.
- Iscan, M. Y. in Steyn, M. (2013). *The human skeleton in forensic medicine* (3rd ed). Springfield: Charles C. Thomas Publisher.
- Kashyap, V. K., Sahoo, S., Sitalaximi, T. in Trivedi, R. (2006). Deletions in the Y-derived amelogenin gene fragment in the Indian population. *BMC Medical Genetics*, 7. Pridobljeno na <https://bmccmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-7-37>

23. Kastelic, V., Budowle, B. in Drobnič, K. (2009). Validation of SRY marker for forensic casework analysis. *Journal of Forensic Science*, 54(3), 551–555.
24. Kastelic, V. in Drobnič, K. (2012). Določitev zunanlega videza ljudi s preiskavami DNK. *Revija za kriminalistiko in kriminologijo*, 63(3), 225–228.
25. Krishan, K., Chatterjee, P. M., Kanchan, T., Kaur, S., Baryah, N. in Singh, R. K. (2016). A review of sex estimation techniques during examination of skeletal remains in forensic anthropology case-work. *Forensic Science International*, 261. Pridobljeno na <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26926105/>
26. Lattanzi, W., Di Giacomo, M. C., Lenato, G. M., Chimienti, G., Voglino, G., Resta, N. et al. (2005). A large interstitial deletion encompassing the amelogenin gene on the short arm of the Y chromosome. *Human Genetics*, 116(5), 395–401.
27. Lau, E. C., Mohandas, T. K., Shapiro, L. J., Slavkin, H. C. in Sneed, M. L. (1989). Human and mouse amelogenin gene loci are on the sex chromosomes. *Genomics*, 4(2), 162–168.
28. Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422), 709–715.
29. Loreille, O., Ratnayake, S., Bazinet, A. L., Stockwell, T. B., Sommer, D. D., Rohland, N. et al. (2018). Biological sexing of a 4000-year-old egyptian mummy head to assess the potential of nuclear DNA recovery from the most damaged and limited forensic specimens. *Genes (Basel)*, 9(3). Pridobljeno na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5867856/>
30. Lugli, F., Di Rocco, G., Vazzana, A., Genovese, F., Pinetti, D., Cilli, E. et al. (2019). Enamel peptides reveal the sex of the Late Antique 'Lovers of Modena'. *Scientific Reports*, 9(1). Pridobljeno na <https://www.nature.com/articles/s41598-019-49562-7>
31. Ma, Y., Kuang, J. Z., Zhang, J., Wang, G. M., Wang, Y. J., Jin, W. M. et al. (2012). Y chromosome interstitial deletion induced Y-STR allele dropout in AMELY-negative individuals. *International Journal of Legal Medicine*, 126(5), 713–724.
32. Michael, A. in Brauner, P. (2004). Erroneous gender identification by the amelogenin sex test. *Jornal of Forensic Science*, 49(2), 258–259.
33. Mitchell, R. J., Kreskas, M., Baxter, E., Buffalino, L. in Van Oorschot, R. A. (2006). An investigation of sequence deletions of amelogenin (AMELY), a Y-chromosome locus commonly used for gender determination. *Annals of Human Biology*, 33(2), 227–240.
34. Mittler, D. M. in Sheridan, S. G. (1992). Sex determination in subadults using auricular surface morphology: A forensic science perspective. *Journal of Forensic Science*, 37(4), 1068–1075.
35. Ou, X., Chen, W., Chen, H., Zhao, F., Zheng, J., Tong, D. et al. (2012). Null alleles of the X and Y chromosomal amelogenin gene in a Chinese population. *International Journal of Legal Medicine*, 126(4), 513–518.
36. Pahor, D. in Jamnik, P. (2012). Preiskovanje povojnih pobojev v Sloveniji in iskanje podatkov o žrtvah v Centralni abecedni evidenci (CAE). *Revija za kriminalistiko in kriminologijo*, 63(3), 214–224.
37. Parker, G. J., Yip, J. M., Eerkens, J. W., Salemi, M., Durbin-Johnson, B., Kiesow, C. et al. (2019). Sex estimation using sexually dimorphic amelogenin protein fragments in human enamel. *Journal of Archaeological Science*, 101, 169–180.
38. Rebay-Salisbury, K., Janker, L., Pany-Kucera, D., Schuster, D., Spannagl-Steiner, M., Waltenberger, L. et al. (2020). Child murder in the Early Bronze Age: proteomic sex identification of a cold case from Schleinbach, Austria. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 12(11), 265.
39. Santos, F. R., Pandya, A. in Tyler-Smith, C. (1998). Reliability of DNA-based sex tests. *Nature Genetics*, 18(2), 103.
40. Sasaki, S. in Shimokawa, H. (1995). The amelogenin gene. *International Journal of Developmental Biology*, 39(1), 127–133.
41. Schutkowski, H. (1993). Sex determination of infant and juvenile skeletons: I. Morphognotic features. *American Journal of Physical Anthropology*, 90(2), 199–205.
42. Schwark, T., Heinrich, A., Preusse-Prange, A. in von Wurmb-Schwark, N. (2011). Reliable genetic identification of burnt human remains. *Forensic Science International. Genetics*, 5(5), 393–399.
43. Steinlechner, M., Berger, B., Niederstatter, H. in Parson, W. (2002). Rare failures in the amelogenin sex test. *International Journal of Legal Medicine*, 116(2), 117–120.
44. Stewart, N. A., Gerlach, R. F., Gowland, R. L., Gron, K. J. in Montgomery, J. (2017). Sex determination of human remains from peptides in tooth enamel. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 114(52), 13649–13654.
45. Stone, A. C., Milner, G. R., Pääbo, S. in Stoneking, M. (1996). Sex determination of ancient human skeletons using DNA. *American Journal of Physical Anthropology*, 99(2), 231–238.
46. Takayama, T., Takada, N., Suzuki, R., Nagaoka, S., Watanabe, Y., Kumagai, R. et al. (2009). Determination of deleted regions from Yp11.2 of an amelogenin negative male. *Legal Medicine*, 11(1), 578–580.
47. Thangaraj, K., Reddy, A. G. in Singh, L. (2002). Is the amelogenin gene reliable for gender identification in forensic casework and prenatal diagnosis? *International Journal of Legal Medicine*, 116(2), 121–123.
48. Trapečar, M. (2017). Delovna skupina za identifikacijo žrtev množičnih nesreč. *Revija za kriminalistiko in kriminologijo*, 68(1), 53–61.
49. Wasinger, V. C., Curnoe, D., Bustamante, S., Mendoza, R., Shoocongdej, R., Adler, L. et al. (2019). Analysis of the Preserved Amino Acid Bias in Peptide Profiles of Iron Age Teeth from a Tropical Environment Enable Sexing of Individuals Using Amelogenin MRM. *Proteomics*, 19(5), e1800341. Pridobljeno na <https://doi.org/10.1002/pmic.201800341>
50. Westen, A. A., Kraaijenbrink, T., Robles de Medina, E. A., Hartevelde, J., Willemsse, P., Zuniga, S. B. et al. (2014). Comparing six commercial autosomal STR kits in a large Dutch population sample. *Forensic Science International. Genetics*, 10, 55–63.
51. White, T. D., Black, M. T. in Folkens, P. A. (2011). *Human Osteology* (3rd ed.). San Diego: Elsevier.
52. Xie, J., Shao, C., Xu, H., Zhu, W., Liu, Z., Tang, Q. et al. (2014). Deletion mapping of the regions with AMELY from two Chinese males. *Legal Medicine*, 16(5), 290–292.
53. Yong, R. Y., Gan, L. S., Chang, Y. M. in Yap, E. P. (2007). Molecular characterization of a polymorphic 3-Mb deletion at chromosome Yp11.2 containing the AMELY locus in Singapore and Malaysia populations. *Human Genetics*, 122(3-4), 237–249.
54. Ziganshin, R. H., Berezina, N. Y., Alexandrov, P. L., Ryabinin, V. V. in Buzhilova, A. P. (2020). Optimization of method for human sex determination using peptidome analysis of teeth enamel from teeth of different biological generation, archeological age, and degrees of taphonomic preservation. *Biochemistry (Mosc)*, 85(5), 614–622.

Determination of Sex Based on Sexually Dimorphic Amelogenin Peptides in Human Tooth Enamel

Marko Fonovič, Ph.D., Associate Professor of Biochemistry, Department of Biochemistry, Molecular and Structural Biology, Jožef Stefan Institute, Slovenia. E-mail: marko.fonovic@ijs.si

Tamara Leskovar, Ph.D., Assistant Professor of Archaeological Science and Archaeometry, Faculty of Arts, University of Ljubljana, Slovenia. E-mail: tamara.leskovar@ff.uni-lj.si

Iztok Štamfelj, Ph.D., Assistant Professor of Dental Diseases and Normal Morphology of the Dental Organ, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Slovenia. E-mail: iztok.stamfelj@mf.uni-lj.si

The determination of sex in forensic and anthropological analyses of human skeletal remains depends mainly on the sexually dimorphic morphological characteristics of the skeleton and on the analysis of molecular markers on the sex chromosomes. Recent advances in proteome analysis of the enamel using mass spectrometry have made it possible to determine the sex based on the identification of sexually dimorphic peptides of amelogenin. Amelogenin proteins are encoded by the AMELX gene on the X chromosome and AMELY on the Y chromosome. In female enamel, there are amelogenin peptides specific for the X chromosome (APX), and in male enamel, there are also amelogenin peptides specific for the Y chromosome (APY). For this research, we used teeth extracted during dental treatment in three female and three male patients. The peptides were extracted by etching the enamel surface with hydrochloric acid for 2 minutes, which did not observably change the size and shape of the tooth crowns. The etched products were analysed using liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The PEAKS software package and the nrNCBI human protein database were used to identify the peptides. Based on the identification of the peptide pairs AMELX-(44-50) (SIRPPYP) and AMELY-(58-65) (SMIRPPYS), we were able to determine the sex of all individuals correctly. In males, fewer than 5 APY, which are crucial for the determination of male sex, were identified in the samples. Therefore, we recommend the use of extraction protocols with prolonged enamel etching or protocols with the removal of a piece of enamel. Previous research, conducted mostly on teeth from archaeological collections, has shown that the proteomic method is the most sensitive and allows sex determination, even in cases where osteological and DNA analysis fail. This new method represents a proteomic version of the amelogenin test, with which it shares a common disadvantage – incorrect sex determination in males with AMELY deletion because they have only APX in their enamel. Although the percentage of AMELY negative men is greater than 1% only in the populations of the Indian subcontinent, the problem cannot be neglected, as incorrect sex determination can have serious consequences for the course of a criminal investigation. By validating the method on a large number of differently preserved recent teeth and determining the most optimal laboratory protocol, the proteomic method could be established as a complementary method for sex determination in combination with established forensic DNA analyses.

Keywords: sex determination, tooth enamel, peptides, amelogenin, LC-MS/MS

UDC: 343.983.2