

Alenka Erjavec Škerget*

Zgodba o človekovem kromosomu X

POVZETEK

Organizacija človeškega genoma od osnovne molekule DNA, preko kondenzacije v kromatin in formacije naprej v kromosome, je dobro znano dejstvo že zadnjega pol stoletja.

Normalna telesna človeška celica vsebuje 46 kromosomov, od katerih je 23 podedovanih od matere, 23 je po izvoru očetovih. 22 parov kromosomov so t.i. avtosomi ali telesni kromosomi, preostala 2 kromosoma sta spolna kromosoma ali imenovana tudi alo-kromosoma ali geno-kromosoma.

V spolnih celicah je skupno število kromosomov prepolovljeno (23). S tem je omogočeno, da šele po združitvi dveh spolnih celic, ob nastanku oplojene jajčne celice, le-ta enakovredno vsebuje genetske informacije od obeh staršev, ki so zbrane na 46 kromosomih. Na tak način se ohranjata konstantno število kromosomov in enakomerna zastopanost količine genoma podedovanega od obeh staršev.

Kromosom X je eden od dveh spolnih kromosomov in sodi med najbolj poseben kromosom tako glede strukture kot tudi njegove funkcije. Predstavnice ženskega spola v skupini sesalcev so namreč nosilke dveh kromosomov X v primerjavi z moškimi predstavniki, ki imajo samo eno kopijo kromosoma X. Kompenzacija uravnotežene količine genetskega materiala med spoloma je tako kljub neenaki količini izhodnega genetskega materiala omogočena preko posebnega procesa, imenovanega inaktivacija kromosoma X, ki je značilna za ženske osebe pri sesalcih. V prispevku bodo predstavljena dejstva o zgradbi kromosoma X ter vplivi do sedaj poznane strukture na njegovo funkcioniranje. Predstavljeni bodo izsledki glede do sedaj znanih tehnologij za odkrivanje in določanje načina funkcioniranja kromosoma X preko procesa inaktivacije ter natančneje predstavljena metodologija, ki jo uporabljamo za odkrivanje omenjenega procesa za diagnostične namene.

Ključne besede: kromosom X, humana genetika, citogenetika, inaktivacija.

Uvod

Kromosom X je eden od večjih kromosomov v človeškem genomu. Vsebuje 1098 (Ross, MT et al., 2005) genov, kar predstavlja okrog 4% vseh genov v humanem genomu. Sestavljajo ga večinoma visoko ponavljajoče se nekodirajoče regije DNA. Ocenjuje se, da sta spolna kromosoma X in Y nastala pred 300 milijoni let, o čemer priča 54 enakih genov, ki jih vsebujeta oba spolna kromosoma (Williams, 2012). Zaradi prisotnosti dveh kromosomov X v ženskih telesnih celicah imajo ženske cca 3% več genetskega materiala od moških predstavnikov (Sanders, 2009). Kar bi teoretično pomenilo, da imajo ženske potencialno sposobnost proizvajati več tovrstnih proteinskih produktov. Vendar se v resničnem življenju tovrstni scenarij običajno ne opaža, tako da z eksperimentalno podprtimi dejstvi velja, da imajo ženske in moški identičen aktivni del genoma (Arnold, 2004). O razlogih zato pa več v nadaljevanju.

Zahtevni mehanizmi regulacije namreč vodijo v evolucijske in fizične razlike v izražanju genov med vrstami in tudi med spoloma, posamezniki, razvojnimi stopnjami, tkivi in tipi celic.

Geni na kromosomu X sesalcev so pri samcih prisotni v eni kopiji, pri samicah pa v dveh. Regulacija kromosoma X vključuje več mehanizmov, eden od njih je inaktivacija X kromosoma, kar pomeni utišanje enega kromosoma X pri samicah sesalcev v somatskih celicah. Namen vseh mehanizmov je izenačenje izražanja genov, ki so povezani s kromosomom X. Neuspešno izenačenje pa običajno vodi v smrt že v začetku razvoja.

Zgradba kromosoma X

Na kromosom X vezane gene lahko razdelimo na gene, značilne za moški spol (npr. kodirajoči geni za proteine, ki se izražajo v testisih), geni značilni za ženski spol (stara skupina genov, ki ima visoko stopnjo izražanja v jajčnikih) ter gene, značilne za nevrološke funkcije (mutacije genov na kromosomu X so 3,5krat bolj pogosto povezane z umsko prizadetostjo kot avtosomske mutacije. Učinki teh mutacij se razlikujejo pri ženskah zaradi nenaključne inaktivacije kromosoma X ali zaradi pobega pri XCI. Tudi to je razlog, da je umska prizadetost bolj pogosta pri moških kot pri ženskah (Puck et al., 1998).

Način, ki pojasnjuje, kako prihaja do sprememb na ravni izražanja kromosoma X, predvideva obstoj dveh različnih mehanizmov: ali preko histon-acetiltransferaze KAT8 posredovanega mehanizma, ki vpliva na začetek transkripcije ali

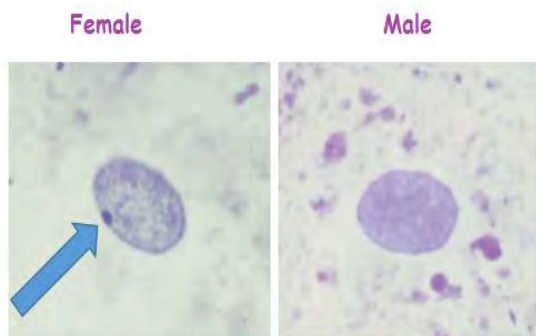
¹ Univerzitetni klinični center Maribor, Klinika za ginekologijo in perinatologijo, Laboratorij za medicinsko genetiko, Ljubljanska 5, 2000 Maribor
E-naslov: alenka.erjavec@ukc-mb.si

preko drugega mehanizma, ki vpliva na zvišanje razpolovnega časa RNA (Rinn, JL, 2012).



Slika 1. Citogenetska struktura kromosoma X z označeno lokacijo za preiskovani gen HUMARA (HUMANI Androgeni Receptor) (povzeto po <https://genome.ucsc.edu>).

Inaktivacija kromosoma X (lionizacija) je proces, kjer se eden od dveh kromosomov X pri ženskih sesalcih inaktivira tako, da postane transkripcijsko neaktiven. Proces nastanka t.i. Barrovega telesca (del heterokromatina kromosoma X) se zgodi v gastrulacijski fazi embrionalnega razvoja, večinoma ga opravijo dolge nekodirajoče RNA molekule (long nc-RNA) (Froberg, 2013). Običajno gre za naključni proces, katerega namen je uravnoteženje količine X transkriptov, obstajajo pa tudi izjeme (vrečarji, *Drosophila melanogaster*) (Potrzebowski, 2008).



Barr body, an inactivated X chromosome

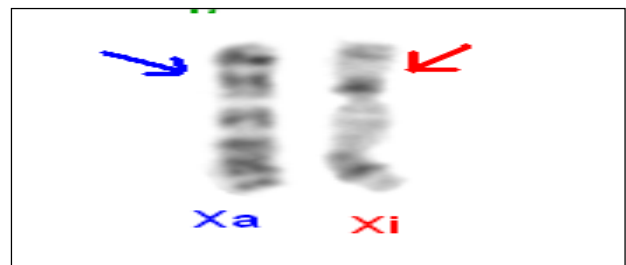
Slika 2. Primer Barrovega telesca oz. inaktiviranega kromatina (heterokromatina) v ženskih celicah (povzeto po http://www.easynotecards.com/notecard_set/74649).

Inaktivacija kromosoma X je lepo vidna pri mačkah barve calico (želvovinaste mačke). Gre za samice, katerih barvo dlake določa gen, ki se nahaja na kromosomu X, pri čemer nosi en kromosom gen za rumeno barvo, drugi kromosom pa gen za črno barvo dlake. Po naključni inaktivaciji enega od kromosomov X nastanejo rumena ali črna območja obarvanosti dlake mačke samice. Samci pasme calico mačk so vedno enobarvni, črni ali rumeni, odvisno od tega, kateri kromosom so podedovali od mame.

Zaradi težnje k uravnoteženju količine izraženih genov, povezanih s spolnimi kromosomi, je večina genov na enem kromosomu X pri ženskah utišanih. So pa na kromosomu X bili najdeni geni, ki pobegnejo X inaktivaciji in se izražajo iz obeh kromosomov X (Berletsch et al. 2011). To pomeni, da njihova aktivnost dosega vsaj 10% aktivnosti alela na aktivnem kromosomu. Gre za ti. pseudoavtosomne gene, ki so na psevdavtosomalnih regijah; pogosto pobegnejo inaktivaciji tudi homologni genovi s kromosoma Y in pa tisti geni, ki so svoj

homolog na kromosomu Y med evolucijo izgubili. Vsem pobeglim genom je skupno, da so po kromosomu razporejeni sicer neenakomerno, vendar pa ne naključno (vpliv oddaljenosti od inaktivacijskega centra in vpliv sosedskih domen). Ocenjujejo da 15% vseh genov na utišanem kromosomu pobegne inaktivaciji. Epigenetski označevalci so tisti, ki vplivajo na izražanje genov na inaktivnem kromosomu Xi (npr trimetilacija lizina 27 na histonu H3-za utišanje gena na Xi; acetilacija na histonih H3 in H4 – aktivni označevalec pri pobeglih genih na Xi).

Čeprav je večina pobeglih genov stalno aktivna, 10% genov ne pobegne vedno oz. se njihovo izražanje spreminja skozi razvoj posameznice (Hysolli et al. 2012). Zaradi tega prihaja tudi do razlik med ženskami in do različnih stanj bolezni, ki so povezane z nenavadnimi kombinacijami spolnih kromosomov.



Slika 3. Izsek iz kariograma normalne ženske celice s prikazom stanja kromosomov X po RBG načinu obdelave celičnih preparatov iz celične kulture perifernih limfocitov; modra puščica prikazuje aktiven kromosom X, ki ima intenzivnejše svetle in temne proge; rdeča puščica kaže inaktiven kromosom X, ki ima manj temnih prog in večja svetlo progana področja.

Pri ženskah je namreč vpliv mutacij s kromosoma X na fenotip odvisen tudi od načina regulacije izražanja določenega X kromosoma. Medtem, ko moške prizadene vsaka mutacija na kromosomu X, dominantna ali recesivna, je pri ženskah fenotipski vpliv odvisen tudi od tega ali je mutiran gen podvržen Xinaktivaciji ali ji pobegne. Na tak način je lahko izražanje mutiranih genov na kromosomu X utišano z naključno inaktivacijo, kar vodi do mozaicizma. Lahko pa je vpliv mutacije popolnoma izničen ravno zaradi kompletne inaktivacije kromosoma, ki nosi mutiran alel, kar je selekcijsko prednostno za organizem. V tem primeru govorimo o nenaključni ali selektivni inaktivaciji. Gre za dokaj pogost pojav pri ženskih osebah, ki se običajno pojavlja pri tistih tipih celic, v katerih je izražanje normalnega alela ključnega pomena.

Ko enkrat kromosom X postane neaktiven, se naj njegova oblika ne bi več spreminjala in tak ostane celotno življenjsko obdobje celice. Spolne celice so prva izjema v tem smislu. Med njihovim nastajanjem se mora inaktivni kromosom X reaktivirati saj samo na tak način zrele ženske spolne celice, pred delitvijo, vsebujejo dva enakovredna kromosoma X. Gre za še dokaj neznan proces, ki pa v zadnjem času veliko obeta pri umetnem reprogramiranju somatskih celic v pluripotentne celice, namenjene za uporabo v zdravstvene namene (Sirchia, et al. 2005).

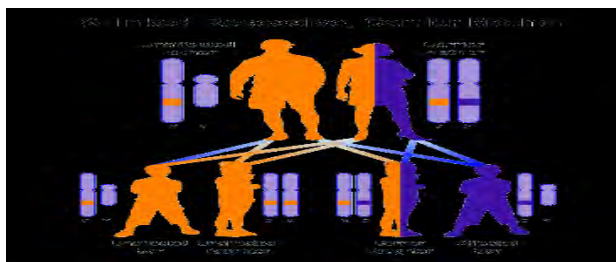
Inaktivacijo kromosoma X je sicer dobro reguliran proces, vendar se lahko zgodijo določene nepravilnosti, ki nato vplivajo na razvoj določenih bolezni. Pri ženskah se tako lahko dogaja,

da se mutiran alel na kromosomu X pri naključni inaktivaciji utiša, kar je velikokrat dovolj, da ne pride do kliničnih znakov bolezni (Orstavik KH et al., 2006). Lahko pa se izvede t.i. nenaključna ali selektivna inaktivacija, kar pomeni da se v večini celic inaktivira isti kromosom: ali tisti z mutiranim alelom (kar je selekcijsko gledano prednostno) ali po naključju kromosom z normalnim alelom. Posledica obeh dogodkov je različna klinična slika, kjer se fenotipsko mutacija popolnoma izrazi ali pa se mutacija ne izraža in do bolezni ne pride. Fenotipski znaki se razlikujejo tudi glede na to, kateri geni uidejo XCI in ali so ti geni podvrženi reaktivaciji na kromosomu; v obeh primerih je to lahko vzrok za bolezen.

Genetsko določanje spola

Pri določevanju spola so iz spolnih kromosomov pomembni geni iz družine SOX, ki kodirajo transkripcijske faktorje in so večinoma prisotni na spolnih kromosomih. Poleg gena SRY (angl. Sex determining region), ki leži na kromosomu Y, in gena SOX 9, ki pozitivno vplivata na razvoj testisov, ima pomembno vlogo še gen SOX3 iz kromosoma X, ki inhibira SOX9 in s tem zaustavi razvoj testisov pri ženskih osebkih. Tako na začetku razvoja opazimo večje izražanje genov specifičnih za moški spol, kasneje se to spremeni in X začne izražati žensko specifične gene (deng, 2014).

Iz predstavljene zgodbe o kromosomu X vidimo, da je določitev načina inaktivacije lahko koristen diagnostični pripomoček že v začetni fazi iskanja vzrokov za določene fenotipske znake, ki nakazujejo na obstoj genetskega vzroka, vezanega na kromosom X. Namen našega dela je bil vpeljati, ovrednotiti in uporabiti metodologijo določanja načina inaktivacije pri ženskih osebkih, ob predpogoju, da so nosilke heterozigotnega stanja za preiskovani gen (HUMARA). Gre za metodologijo, ki bazira na delovanju metilacijsko občutljivih restrikcijskih encimov, ki so indikator o tem, ali je do metilacije (oz. inaktivacije) prislo ali ne. Pričakujemo, da bo največjo uporabnost vpeljana tehnologija dosegla na področju psihiatrične medicine, npr pri preiskovanju na kromosom X vezane idiopatskih duševnih motenj ter na drugih področjih medicine, ki se ukvarjajo z na spol vezanimi kliničnimi znaki.



Slika 4. Prikaz načina dedovanja na kromosom X vezanih genov (povzeto po: <http://jmg.bmj.com/content/38/7/4359>).

Materiali in metodologija

Izolacija in karakterizacija genomske DNA preiskovanke

Iz periferne krvi preiskovank, je v prvotni fazi potrebno izolirati genomsko DNA. Izolacijo smo izvedli po standardnem protokolu laboratorija (SOP MGL 201). Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo pomnoževali mikrosatelite s področja človeškega androgenega receptorskega gena (HUMARA). Začetni oligonukleotidi so bili izbrani iz področja CpG otočkov (v eksonu 1) gena HUMARA. Samo tiste preiskovanke, ki so nosilke heterozigotnega stanja (dve različni obliki gena), so primerne za nadaljnjo analizo z opisano metodologijo.

Restrikcija, pomnoževanje z verižno reakcijo s polimerazo in kapilarna elektroforeza

Proces inaktivacije biokemijsko temelji na osnovah metilacije. Zato lahko za proučevanje inaktivacijskih procesov uporabljamo t.i. metilacijsko občutljive restrikcijske encime. Uporabili smo restriktazo *HPAI*, s katero smo obdelali genomsko DNA posamezne heterozigotne preiskovanke. Sledila je verižna reakcija s polimerazo (PCR), kjer smo pomnoževali mikrosatelite s področja gena HUMARA. Pomnožene produkte PCR smo vrednotili s kapilarno elektroforezo z Beckman Coulter CEQ 800 apparatus.

Interpretacija rezultatov in statistična analiza

Izračunavali smo razmerje med višino obeh specifičnih vrhov, ki označujeta posamezni mikrosatelitni zmnožek po PCR. Primerjali smo vrednosti, t.p. velikosti vrhov med restrikcijsko obdelano in nativno genomsko DNA posamezne preiskovanke. Glede na pridobljeno vrednost razmerja smo preiskovankam določili stopnjo IKX.

Rezultati

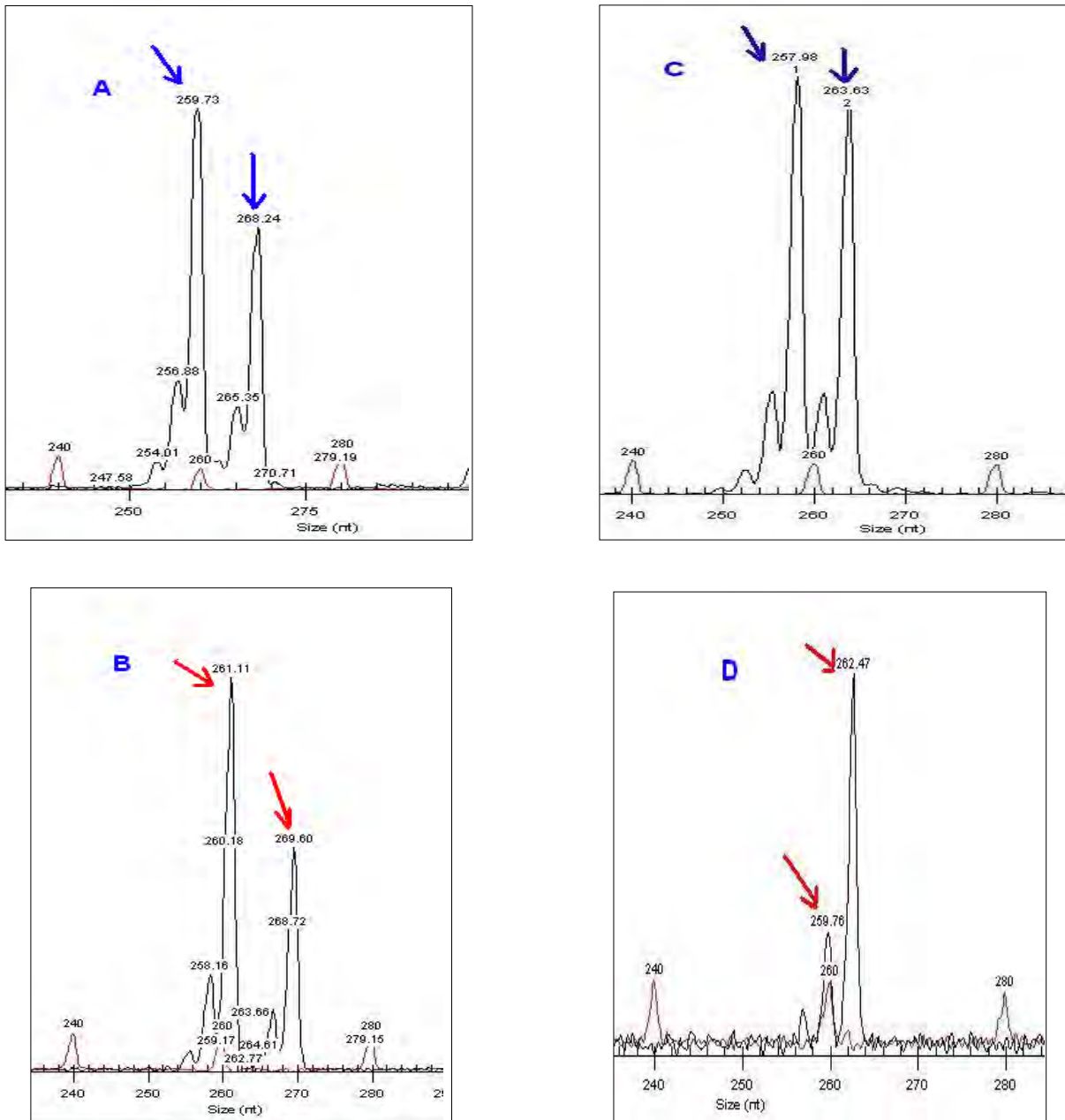
Na kromosom X vezani androgeni receptor je bil uporabljen kot marker za proučevanje IKX. Gre za uporabni marker, s katerim na enostaven in zanesljiv način določimo status inaktivacije, vendar izključno pri heterozigotnih preiskovankah. Gen za človeški androgeni receptor (*AR*, ang. androgen receptor) namreč vsebuje visoko polimorfne trinukleotidne CAG ponovitve v prvem eksonu. Inaktivacija kromosoma X tako korelira z metilacijo mest za *HpaII* in *HpaI* encimoma, ki se nahajata manj kot 100 bp stran od mesta teh CAG ponovitev (Allen in sod., 1992).

Interpretacija rezultatov in statistična analiza

Izračunavali smo razmerje med višino obeh specifičnih vrhov, ki označujeta posamezni mikrosatelitni zmnožek po PCR. Primerjali smo vrednosti, t.p. velikosti vrhov med restrikcijsko obdelano in nativno genomsko DNA posamezne preiskovanke. Glede na pridobljeno vrednost razmerja smo preiskovankam določili stopnjo IKX.

Iz pridobljenih rezultatov analiz, opravljenih na kontrolni skupini 100 heterozigotnih zdravih preiskovank, smo določili

mejne vrednosti: Pri naključni IKX je razmerje v velikostnem rangu od 0,5 do 3,3 in o nenaključni ali selektivni IKX govorimo, ko je razmerje manjše od 0,5 ali večje od 3,3.



Slika 5: Rezultati po kapilarni elektroforezi pridobljenih produktov PCR pred in po obdelavi z metilacijsko občutljivimi restrikcijskimi encimi;

A: dve modri puščici nakazujeta stanje PRED obdelavi z restriktazami; vidimo prisotnost dveh alelov, različnih glede dolžine bp, višina oz. površina pod posameznim vrhom predstavlja količino posameznega produkta;

B: dve rdeči puščici nakazujeta stanje dveh alelov PO restrikcijski obdelavi; vidimo prisotnost dveh alelov, različnih glede dolžine bp; razmerje med višinama oz. po površinama se

v primerjavi s sliko A ni bistveno spremenilo; prikazan je primer naključne inaktivacije kromosoma X;

C: stanje produktov dveh heterozigotnih alelov (dve modri puščici) PRED obdelavo z restriktazami pri preiskovancu; vidimo prisotnost dveh alelov, različnih glede dolžine bp, višina oz. površina pod posameznim vrhom predstavlja količino posameznega produkta;

D: stanje PO restrikcijski obdelavi pri preiskovancu C: dve rdeči puščici nakazujeta prisotnost dveh alelov, različnih glede dolžine bp; pri čemer se je razmerje med višinama oz. površinama v primerjavi s sliko C bistveno spremenilo; prikazan je primer nenaključne ali selektivne inaktivacije kromosoma X.

5. Diskusija z zaključkom

Pri osebah ženskega spola v skupini vseh sesalcev prihaja zaradi uravnavanja genske ekspresije med moškimi in ženskimi osebami do procesa imenovanega inaktivacija kromosoma X (IKX). Običajno ta proces poteka kot naključni dogodek pri izbiri, kateri od starševskih kromosomov X se bo inaktiviral. V takih primerih je razmerje med obema kromosomoma X enako, torej 1:1. Vsako značilno odstopanje od tega razmerja pomeni, da proces ni potekal naključno in v tem primeru gre za t.i. nenaključno ali selektivno inaktivacijo kromosoma X (NIKX). NIKX je bila pogosteje opažena v primerih tistih žensk, ki so nosilke kakršnekoli genetske spremembe na kromosomu X. Proces inaktivacije namreč lahko predstavlja tudi pomemben zaščitni mehanizem za osebo, ker s svojim onemogočanjem izražanja predstavlja zaščito pred potencialnimi letalnimi fenotipskimi posledicami, kar je že dokumentirano tako za majhne mutacije kot tudi za večje strukturne genske variabilnosti, vezane na kromosom X.

Pogosto se povezujejo najdene spremembe na kromosomu X s pojavom klinično definiranih duševnih motenj. CNV kot strukturne genske variabilnosti sodijo med najpogostejše genetske vzroke za pojav motenj v duševnem razvoju. V primerih, ko se nahajajo na kromosomu X, lahko posredno vplivajo na inaktivacijski proces. Še posebej zanimivo je stanje pri ženskah z mutacijo na enem od kromosomov X, pri katerih je značilni fenotip ponavadi blažji ali celo odsoten, kar pojasnjujejo s pojavom selektivne inaktivacije kromosoma X.

Za določanje načina inaktivacije kromosoma X obstaja več metod, katerih osnove temeljijo ali na principu hibridizacije (Southern blot), ali na principu verižne reakcije s polimerazo (PCR) v kombinaciji z analizo polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP, ang. restriction fragment length polymorphism) oz. posebno izvedbo t.i. metilacijsko občutljive PCR.

V rutinsko diagnostično delo laboratorija smo želeli vpeljati metodologijo določanja vrste inaktivacije kromosoma X pri posameznih preiskovankah. Zaradi učinkovitosti, stroškovne vrednosti in narave dela smo izbrali metodologijo na osnovi PCR v kombinaciji z metilacijsko občutljivo-RFLP tehnologijo. Uporaba restrikcijskih encimov *HpaII* in *HpaI* je namreč klasična metoda analize metilacije na podlagi lastnosti restrikcijskih encimov, ki nimajo zmožnosti rezanja (cepitve) metilirane DNA. Ker je pri evkariontski DNA le citozin v CpG otočkih lahko metiliran, se za restrikcijo uporabljajo encimi, ki cepijo znotraj CG zaporedij. Encim *HpaII* prepozna CCGG sekvenco, vendar ne more cepiti DNA, ko je citozin metiliran. Ta lastnost omogoča encimu *HpaII*, da na podlagi njegovega delovanja lahko določimo relativno hitro analizo metilacijskega vzorca, ki ga pregledujemo (Guerrero, 2013). Metodologija, ki temelji na RFLP – PCR metodi, je sicer manj informativna v primerjavi s testi, ki temeljijo na metilacijsko občutljivi-PCR metodi s kratkim tandemskim ponovitvam (STR-PCR). Na podlagi naših izkušenj pa ocenjujemo, da je enostavnejša ter stroškovno bolj sprejemljiva metoda, primerna predvsem za obdelavo posameznega vzorca.

Uspešno smo v diagnostično delo Laboratorija za medicinsko genetiko, UKC Maribor vpeljali tehnologijo, osnovano na PCR-RFLP metodologiji. Določili smo pogoje

dela, jih preverili, optimizirali ter uvedli standardni operativni postopek, s katerim izvajamo opisano tehnologijo. Kot diagnostično tehniko jo uporabljamo pri analizi nenaključne inaktivacije kromosoma X pri ženskih osebkih, ki so že znane ali so potencialne nosilke X-vezanih recesivnih bolezni, pri ženskih osebkih, obolenih z X-vezano boleznijo in pri ženskih osebkih, ki so nosilke X-vezane dominantne bolezni. Poseben potencial preiskovanja načina inaktivacije in vpliv le-tega se kaže pri preiskovanju duševnih motenj oz. posebnih nevroloških stanj, katerih vzrok so lahko geni, prisotni na kromosomu X ter pri tistih medicinskih diagnozah, ki so vezane na spol posamezne osebe (moški/ženski) ali vplivajo na njegovo reprodukcijo.

Kromosom X namreč vsebuje mnogo genov, pomembnih za življenje sesalcev, kar je razvidno po velikem številu dednih bolezni, ki jih povzročajo mutacije na kromosomu X. Vsaka celica, ne glede na spol, mora imeti vsaj en kromosom X. Primanjkljaj kromosoma X (monosomija Y) je embrio-letalna sprememba. Pomen kromosoma X se kaže tudi v podatkih, da čeprav kromosom X vsebuje cca 4% vseh genov v humanem genomu, so napake v njegovih genih odgovorne za 10% vseh dednih bolezni, katerim vzrok je sprememba v enem genu (monogenske bolezni) pri človeku (izmed 1 113 opisanih monogenetskih b.).

Zahvala

Avtorica prispevka se zahvaljuje celotnemu kolektivu Laboratorija za medicinsko genetiko UKC maribor, ki so kakorkoli pripomogli k uspešnemu delu, katerega rezultat je objava pričujočega prispevka. Del objavljenih rezultatov je bil opravljen v okviru magistrske naloge Ivane Jurkovič, ki ga opravlja na Biotehniški fakulteti, Oddelku za biologijo, Univerze v Ljubljani.

Literatura

- Williams R., Sex Drives Chromosome Evolution, 19.7 2012. (citirano 3.5 2015) <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/32368/title/Sex-Drives-Chromosome-Evolution/>.
- Sanders R., The story of X — evolution of a sex chromosome, 16. 4 2009, (citirano 3.5. 2015): http://www.berkeley.edu/news/media/releases/2009/04/16_xchrom.shtml.
- Pereza N, Ostojic S., Zgodba o X in Y, (citirano: 3.5.2015) <http://www.zjzpgz.hr/nzl/67/iks.htm>.
- Potrzebowski, L.; Vinckenbosch, N.; Marques, A. C.; Chalmel, F.; Jegou, B.; Kaessmann, H.; Chromosomal Gene Movements Reflect the Recent Origin and Biology of Therian Sex Chromosomes; Plos biology, april 2008, 6, str. 709-716.
- http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Inaktivacija_kromosoma_X.
- Deng, X. D., Berletch, J.B., Nguyen, D.K., Disteche, C. M.: X chromosome regulation: diverse patterns in development, tissues and disease, Nat Rev Genet., [online] 6, (10), 2014, 367-378.
- Arnold, A., P.: Sex chromosomes and brain gender, Nature Reviews, Neuroscience., [online] (5), 2004, 1-8.

8. Puck, Jennifer M., Willard, Huntington F. X Inactivation in Females with X-Linked Disease. *The New England Journal of Medicine*, 1998, letnik 338, str. 325-328.
9. Hysolli E., Wook Jung Y., Tanaka Y., Kim K. in Park I. The lesser known story of X-chromosome reactivation. *Cell Cycle*, 2012, vol. 11, str. 229 -233.
10. Berletch, J.B., Yang, F., Xu, J., Carrel, L. in Disteche, C.M. Genes that escape from X inactivation. *Human genetics*, 2011, letn. 130, št. 2, str. 237-245.
11. Rinn, J. L. in Chang H.Y. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annual Review of Biochemistry*, 2012, letnik 81, str. 145-166.
12. Froberg, J. E., Yang L. in Lee J. T. Guided by RNAs: X-inactivation as a model for lncRNA function, *Journal of Molecular Biology*, 2013, vol. 425, št. 19, str. 3698–3706.
13. Lyon, M. F. The Lyon and the LINE hypothesis, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2003, vol. 14, št. 6, str. 313-318.
14. Sirchia, S. M., Ramoscelli, L., Grati, R. F., Barbera, F., Coradini, D., Rossella, F., Porta, G., Lesma, E., Ruggeri, A., Radice, P., Simoni, G. in Miozzo, M. Loss of the Inactive X Chromosome and Replication of the Active X in BRCA1-Defective and Wild-type Breast Cancer Cells, *Cancer Research*, 2005, vol. 65, št. 6, str. 2139-3146.
15. Ørstavik KH. Skewed X inactivation in healthy individuals and in different diseases. *Acta Paediatr Suppl.* 2006 Apr;95(451):24-9. Review.
16. Ross MT et. al.. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*. 2005 Mar 17; 434(7031): 325–337.
17. https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chrX%3A67568889%2D67724288&hgsid=610224041_LUhQxQQ0bXqvV5kiaPzPNfDyAVpK.
18. http://www.easynotecards.com/notecard_set/74649.
19. <http://jmg.bmj.com/content/38/7/435>.