

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Laura Matoušková

Odhad věku donora lidského biologického materiálu na základě metylace DNA

Age estimation from human biological material based on DNA methylation

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Iva Kulichová

Praha, 2020

Prohlášení:

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

V Praze, 11. 8. 2020

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména své vedoucí Mgr. Ivě Kulichové za její odborné rady, ochotu a trpělivost, s jakou se vedení mé práce věnovala po celou dobu jejího vzniku. Za mnohé podněty ke zlepšení textu děkuji i Mgr. Tereze Veselkové a v neposlední řadě děkuji Mgr. Halině Šimkové a Mgr. Vlastimilu Stenzlovi za jejich cenné konzultace.

Abstrakt

Metylace DNA představuje jednu z epigenetických modifikací, která vykonává v lidském těle mnoho úloh prostřednictvím umlčování genů a udržování genomové stability. Metylační změny se v průběhu života kumulují a současné studie poukazují na to, že míra metylace v určitých úsecích DNA (CpG dinukleotidech) koreluje s chronologickým věkem. Metylační vzorec se ale nemění pouze s přibývajícím věkem, může jej ovlivňovat i mnoho vnějších faktorů souvisejících s životním stylem a biogeografický původ jedinců. Proto je pro úspěšný odhad věku klíčové nalezení takových CpG úseků, které jsou pokud možno nezávislé na ostatních proměnných. Tato práce pojednává o problematice odhadu věku na základě analýzy metylace konkrétních lokusů DNA se zaměřením na její využití ve forenzní praxi.

Klíčová slova

metylace DNA, epigenetika, forenzní genetika, bisulfitová konverze, sekvenování DNA, odhad věku

Abstract

DNA methylation is one of the epigenetics modifications which performs many functions in human body by silencing genes and maintaining genomic stability. Changes in DNA methylation accumulate during life and current studies indicate that the level of methylation in certain loci (CpG dinucleotides) correlates with chronological age. However, the methylation pattern changes not only with increasing age but it can also be affected by our lifestyle choices and biogeographical origin. Therefore, the key for successful age estimation is finding such CpG loci that are independent (or as little dependent as possible) on other variables. This bachelor thesis describes the issue of age estimation based on DNA analysis of specific methylated DNA loci with focus on its application in forensic practice.

Keywords

DNA methylation, epigenetics, forensic genetics, bisulfite conversion, DNA sequencing, age estimation

Seznam zkratek

5-fC	5-formylcytosin
5hmC	5-hydroxymethylcytosin
5mC	5-methylcytosin
aDMRs	odlišně metylované regiony souvisejících s věkem (z angl. <i>age-associated Differentially Methylated Regions</i>)
AID	aktivací indukovaná cytidin deamináza (z angl. <i>Activation Induced cytidine Deaminase</i>)
APOBEC	apolipoproteinový B sestřihový komplex (z angl. <i>Apolipoprotein B Editing Complex</i>)
ATP	adenosintrifosfát (z angl. <i>adenosine triphosphate</i>)
BER	bázová excizní reparace
BMI	index tělesné hmotnosti (z angl. <i>Body Mass Index</i>)
bp	pár bází (z angl. <i>base pair</i>)
CpA	cytosin-fosfát-adenin
CpG	cytosin-fosfát-guanin
CpT	cytosin-fosfát-thymin
CMS	cytosin-5-metylsulfonát
ddNTP	dideoxynukleotid trifosfát (z angl. <i>dideoxynucleotide triphosphate</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DNMT1	DNA metyltransferáza 1
DNMT2	DNA metyltransferáza 2
DNMT3a	DNA metyltransferáza 3a
DNMT3b	DNA metyltransferáza 3b
DNMT3L	DNA metyltransferáza 3L (z angl. <i>DNA methyltransferase 3-like</i>)
DNMTs	DNA metyltransferázy
dsDNA	dvouvláknová DNA (z angl. <i>double stranded DNA</i>)
LINE	dlouhé rozptýlené jaderné elementy (z angl. <i>Long Interspersed Nuclear Elements</i>)
LTR	dlouhé koncové repetice (z angl. <i>Long Terminal Repeats</i>)
MPS	masivně paralelní sekvenování

NaHSO ₃	hydrogensířičitan sodný
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PGM	z angl. <i>Personal Genome Machine</i>
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. <i>Ribonucleic Acid</i>)
SAM	S-adenosylmethionin
SAP	shrimp alkalická fosfatáza (z angl. <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>)
SBE	jedno-bázová extenze (z angl. <i>Single Base Extension</i>)
SINE	krátké rozptýlené jaderné elementy (z angl. <i>Short Interspersed Nuclear Elements</i>)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (z angl. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
ssDNA	jednovláknová DNA (z angl. <i>single strand DNA</i>)
TDG	thymin DNA glykosyláza
TET enzym	z angl. <i>Ten-Eleven Translocation enzyme</i>
WGBS	celogenomové bisulfitové sekvenování (z angl. <i>Whole Genome Bisulfite Sequencing</i>)

Obsah

1. Úvod	9
2. Metylace DNA.....	10
2.1. DNA metyltransferázy	10
2.1.1. DNMT1	11
2.1.2. DNMT3.....	11
2.2. Demethylace DNA	11
2.2.1. Pasivní demethylace.....	12
2.2.2. Aktivní demethylace	12
2.3. Změny v metylaci DNA v průběhu života	13
3. Metody analýzy metylace DNA pro odhad věku	15
3.1. Bisulfitová konverze	15
3.2. Masivně paralelní sekvenování	17
3.3. Pyrosekvenování	17
3.4. Hmotnostní spektrometrie EpiTYPER.....	19
3.5. Minisekvenování SNaPshot	20
4. Odhad věku na základě metylace DNA pro forenzní účely	22
4.1. Modely pro odhad věku.....	22
4.1.1. Horvathův model pro odhad věku.....	22
4.1.2. Tkáňově specifické modely pro odhad věku	23
4.1.2.1. Modely pro analýzu krve	24
4.1.2.2. Modely pro analýzu slin a bukálních stěrů	25
4.1.2.3. Modely pro analýzu ejakulátu.....	26
4.1.2.4. Modely pro analýzu zubů.....	26
4.2. Vliv vnějších faktorů na epigenetický věk.....	27
4.3. Mezipopulační rozdíly v metylaci DNA	28
5. Závěr.....	30
6. Seznam literatury.....	31

1. Úvod

Epigenetika je v současnosti intenzivně se rozvíjející vědní disciplína, která se věnuje změnám v DNA, jenž se neprojevují na její nukleotidové sekvenci. Přesto jsou ale tyto změny dědičné a jejich úroveň se mění během lidského života v závislosti na mnoha proměnných. Jednu z epigenetických změn představuje metylace DNA, jejíž studiem se přišlo mj. na to, že určité odlišně metylované úseky v DNA korelují s chronologickým věkem. Tato práce se bude zabývat problematikou odhadu chronologického věku na základě metylace DNA, především v kontextu forenzního využití.

Odhad lidského věku pomocí analýzy DNA může být využit ve forenzní praxi při různých příležitostech. Jedním z příkladů je situace, kdy je na místě kriminálního činu zajištěn vzorek tkáně, jehož profil DNA se neshoduje s žádným záznamem v DNA databázi. V tomto případě můžeme odhadem věku přiblížit fenotyp pachatele, oběti nebo jiného člověka, který se nacházel na místě činu a zmiňovaný biologický materiál zanechal. Přiblížení fenotypu odhadem věku může být prospěšné i při identifikaci obětí nehod, přírodních katastrof, válečných zločinů nebo u lidských pozůstatků objevených v archeologických nalezištích. Odhad věku lze využít i při řešení geopolitických problémů – jedním z případů je nedávná migrační krize, kdy docházelo k tomu, že se někteří migranti vydávali za mladší, než ve skutečnosti byli.

Cílem této práce je shrnutí dosavadních poznatků v této problematice formou literární rešerše od procesu, jakým dochází k metylačním změnám DNA, přes vývin metylačních změn v průběhu lidského života a způsobů, jakými byly na základě těchto změn odhaleny konkrétní lokusy, které vykazují vysokou korelaci s věkem a jsou vhodné pro forenzní účely, až po určité vnější faktory a jiné okolnosti, které mohou ovlivnit výsledný odhad věku.

2. Metylace DNA

Metylace DNA je epigenetická modifikace katalyzovaná enzymy DNA metyltransferázami (DNMTs); tyto enzymy přenáší metylovou skupinu z S-adenosylmethioninu (SAM) na 5' uhlík cytosinového zbytku za vzniku 5-metylcytosinu (Moore et al., 2013). Patří mezi reverzibilní a dědičné epigenetické modifikace, podléhá četným změnám v průběhu embryonálního vývoje a v menší míře i během života člověka. Byla objevena již v roce 1948 (Hotchkiss, 1948) a v současnosti patří mezi nejlépe prostudované epigenetické modifikace (Conerly and Grady, 2010).

Cytosin bývá v lidské DNA zpravidla metylován v dinukleotidech CpG, můžeme se ovšem také v menší míře setkat s *nonCpG* metylací – jednak během vývoje člověka např. v embryonálních fibroblastech, kde se vyskytují metylované dinukleotidy CpA a CpT (Woodcock et al., 1997), tak i v tkáních dospělých jedinců, např. v mozku (Varley et al., 2013). Vzhledem k tomu, že u *nonCpG* metylace zatím nebyla prozkoumána korelace s věkem, budu se v tomto textu dále zaměřovat pouze na metylaci v dinukleotidech CpG.

Metylace DNA je jedním z významných faktorů mnoha molekulárních mechanismů, které jsou nezbytné pro správný vývoj a funkci lidského organismu. Patří mezi ně například regulace genové exprese, buněčná diferenciaci, genomický imprinting a inaktivace chromozomu X. Obecně můžeme říci, že se metylace DNA podílí na umlčování genů (Jin et al., 2011). Metylovaná DNA také brání transkripci repetitivních úseků DNA (Xu et al., 1999) a podílí se na stabilitě heterochromatinu v centromerických a telomerických oblastech tím, že znemožňuje rekombinaci v těchto částech chromozomů během dělení buněk (Xu et al., 1999). Těmito mechanismy přispívá metylace DNA k udržení genomové stability.

2.1. DNA metyltransferázy

V lidském těle najdeme tři DNA metyltransferázy (DNMTs), které katalyzují přenos metylové skupiny, a to DNMT1, DNMT3a a DNMT3b (viz Obrázek 1). Všechny tyto DNMTs se ve velké míře účastní metylačních procesů v embryonálním vývoji (Moore et al., 2013), přičemž delece každé jednotlivé metyltransferázy je letální (Li et al., 1992). U dvou dalších, DNMT2 a DNMT3L nebyla prokázána metyltransferázová aktivita (Chedin et al., 2002; Liu et al., 2003).

2.1.1. DNMT1

DNMT1 metyluje s vysokou specifitou nemetylovaný řetězec hemimetylovaných CpG úseků během replikace DNA (Valinluck and Sowers, 2007). Tímto způsobem DNMT1 zajišťuje dědičnost metylačního vzorce – udržuje v dceřiných buňkách stejnou úroveň metylace DNA jako v buňce mateřské. Ačkoli byla DNMT1 osekvenována a naklonována na základě své *de novo* metyltransferázové aktivity během *in vitro* experimentu s myšimi buňkami (Bestor et al., 1988), v eukaryotických buňkách *in vivo* zajišťuje především metylaci udržovací (Margot et al., 2000).

2.1.2. DNMT3

DNMT3a a DNMT3b slouží jako *de novo* metyltransferázy (Okano et al., 1999), což znamená, že vytváří nové metylační vzorce na nemodifikovaném vlákně DNA. Přestože je toto rozdělení obecně přijímáno (DNMT1 jakožto udržovací metyltransferáza, DNMT3a a DNMT3b jakožto *de novo* metyltransferázy), novější studie poukazují na to, že je toto rozdělení příliš zjednodušené (Tiedemann et al., 2014). *De novo* metyltransferázy také přispívají k udržovací metylaci v diferencujících se buňkách (Liao et al., 2015).

DNMT3a metyluje přednostně volnou nukleozomální DNA, oproti tomu DNMT3b se významně podílí na metylaci DNA v jádrové oblasti nukleozomu (Takeshima et al., 2006). Přesto se obě *de novo* metyltransferázy v případě potřeby doplňují – až ~96 % CpG oblastí mohou být metylovány při umlčení jedné z metyltransferáz tou druhou (Liao et al., 2015). Katalyticky neaktivní DNMT3L pomáhá oběma těmto enzymům tak, že zvyšuje jejich schopnost vázat se s donorem metylové skupiny (SAM), čímž stimuluje jejich aktivitu (Kareta et al., 2006).

2.2. Demethylace DNA

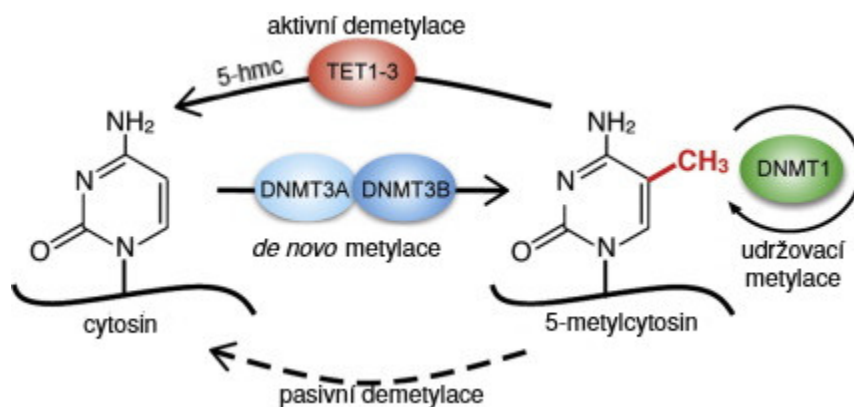
Demethylace DNA může nastat pasivně během replikace v dělících se buňkách nebo aktivně, a to jak v dělících se, tak i v nedělících se typech buněk (znázorněno na Obrázku 1). K aktivní demethylaci dochází vlivem TET enzymů (nazvaných podle translokace mezi chromozomy 10 a 11), metylcytosinových dioxidáz, které metylovaný cytosin oxidují, nebo vlivem deamináz AID (aktivací indukovanou cytidin deaminázou) a APOBEC (apolipoproteinovým B sestříhovým komplexem), které metylovaný cytosin deaminují (Bochtler et al., 2017).

2.2.1. Pasivní demetylace

Pasivní demetylace nastane tehdy, když dojde k inhibici nebo dysfunkci udržovací metyltransferázy DNMT1. Ztráta nebo špatná funkce této metyltransferázy umožňuje cytosinu v nově replikovaném vlákně DNA, aby zůstal nemetylovaný (Moore et al., 2013), i když by měl být správně na základě templátového vlákna metylován. Tento způsob demetylace přispívá k snížení celkové úrovně metylace s každým následujícím dělením.

2.2.2. Aktivní demetylace

Metylovaný cytosin (5mC) může být chemicky modifikován na dvou místech – ve své amino, nebo metylové skupině. K aktivní demetylaci může dojít buď deaminací amino skupiny 5mC za vzniku thyminu (Shen et al., 1994), nebo oxidací metylové skupiny 5mC. Oxidaci 5mC katalyzují TET enzymy, přičemž vzniká 5-hydroxymetylcytosin (5hmC) (Tahiliani et al., 2009). K přeměně 5hmC na cytosin může dojít dvěma způsoby. Za prvé může být dále oxidován TET enzymy až na 5-karboxylcytosin (Ito et al., 2011), za druhé může být deaminován enzymy AID/APOBEC na 5-hydroxymetyluracil (Guo et al., 2011). Obě tyto modifikované báze jsou rozpoznány thymin DNA glykosylázami (TDG), které zahájí báзовou excizní reparaci (BER), dráhu, na jejímž konci je modifikovaná báze nahrazena cytosinem (Cortellino et al., 2011).



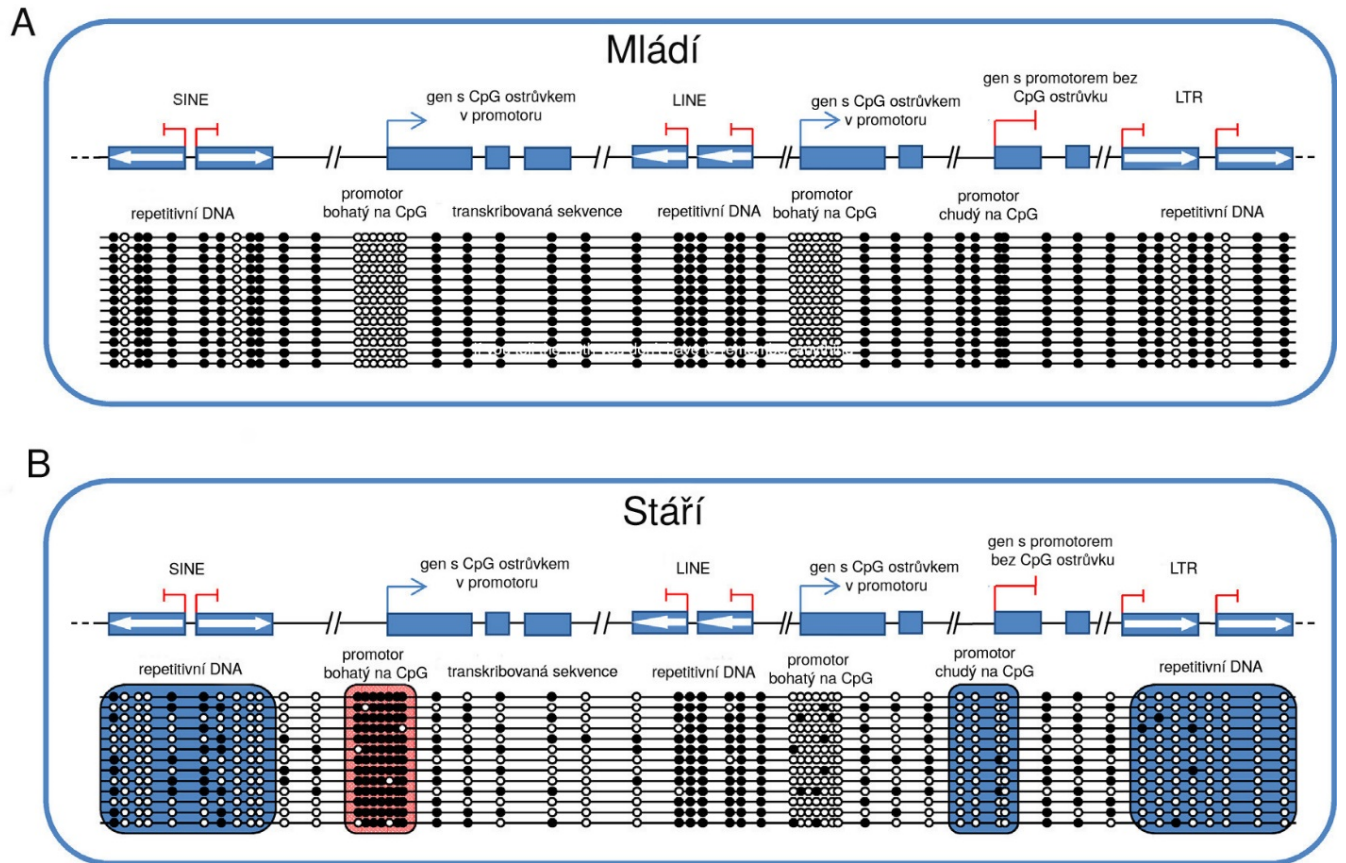
Obrázek 1: Způsoby metylace cytosinu a demetylace jeho derivátů (upraveno podle Ambrosi et al., 2017)

2.3. Změny v metylaci DNA v průběhu života

Lidský genom je po oplození a vzniku zygoty aktivně demetylován (Smith et al., 2014), kromě imprintovaných genů, ve kterých je metylace jedné z alel nezbytná pro správný vývoj jedince (Okoe et al., 2014). Odstraněním metylových značek zděděných od rodičů se buňky embrya stávají totipotentní (Messerschmidt et al., 2014), což znamená, že se mohou diferencovat v jakoukoli buňku, která se v budoucnosti bude v organismu vyskytovat. Během uhnízdění neboli implantace vajíčka dochází k významné *de novo* metylaci genomu, s výjimkou CpG ostrůvků, které jsou proti metylaci chráněny (Laurent et al., 2010). CpG ostrůvky jsou úseky DNA, které jsou bohaté na CpG dinukleotidy a pozitivně ovlivňují transkripční aktivitu genových promotorů (Deaton and Bird, 2011). Vyskytují se především v promotorech tzv. *housekeeping* genů, jejichž aktivita je pro buňky esenciální. Po implantaci dochází i nadále k demetylačním i *de novo* metylačním změnám, avšak tyto modifikace jsou již tkáňově či genově specifické (Luo et al., 2018).

Po narození člověka jednak dochází postupně k rozsáhlé hypometylaci genomu, kdy k největším změnám dochází zejména v oblasti promotorů genů, kde se nachází malé množství CpG dinukleotidů, v repetitivních sekvencích a v tkáňově specifických genech. Oproti tomu v CpG ostrůvcích, které jsou spojeny s promotory genů, dochází k postupné hypermetylaci (znázorněno na Obrázku 2). Tyto změny v metylaci DNA, které jsou spjaty se zvyšujícím se věkem, se souhrnně nazývají epigenetický drift (Heyn et al., 2012).

Epigenetický drift je ovlivňován jak stochastickými chybami v přenosu metylačního vzorce při dělení buněk, tak i okolním prostředím a životním stylem, např. kouřením (Noreen et al., 2014). Z toho vyplývá, že během lidského života dochází k aktivním přeměnám metylačního vzorce, směr těchto změn je ale prakticky nepředvídatelný. Studie ovšem ukazují i přítomnost odlišně metylovaných regionů souvisejících s věkem (aDMRs), které závisí na biologických mechanismech zapojených do procesu stárnutí (Bell et al., 2012). Na základě metylace těchto aDMRs můžeme odhadnout tzv. epigenetický věk, jinak nazýván též epigenetickými hodinami nebo DNAm věkem, který funguje jako indikátor biologického i chronologického věku. Pro forenzní účely je ovšem důležitý odhad chronologického věku, který udává, kolik času uběhlo od data narození člověka, pokud možno nezávisle na ostatních proměnných. Proto byly vytipovány vhodné lokusy a vyvinuty predikční algoritmy chronologického věku, které budou více popsány v dalších kapitolách.



Obrázek 2: Metylační změny v DNA v průběhu života. Černé tečky znázorňují metylované CpG, bílé tečky nemetylované CpG. S tímto se pojí buďto aktivní transkripce (modré šipky) nebo omezení transkripce (červené čárky). Modře zbarvené obdélníky reprezentují hypometylované úseky, červeně zbarvený obdélník hypermetylovaný úsek (upraveno podle Zampieri et al., 2015).

3. Metody analýzy metylace DNA pro odhad věku

Analýza CpG úseků v DNA pro odhad věku je založena na porovnávání množství metylovaných a nemetylovaných cytosinů, které se v daných úsecích vyskytují. Výsledný poměr se nazývá β -hodnota a nabývá hodnot 0–1 (ev. 0–100 %). Vzhledem k tomu, že se metylované i nemetylované cytosiny párují se stejnou bází (guaninem), jsou pro konvenční molekulárně biologické metody těžko rozlišitelné (Jung et al., 2015). Z tohoto důvodu je využívána metoda bisulfitové konverze, kdy je vzorek nejprve ošetřen hydrogensířičitanem sodným, což nám umožní tyto dvě báze od sebe odlišit.

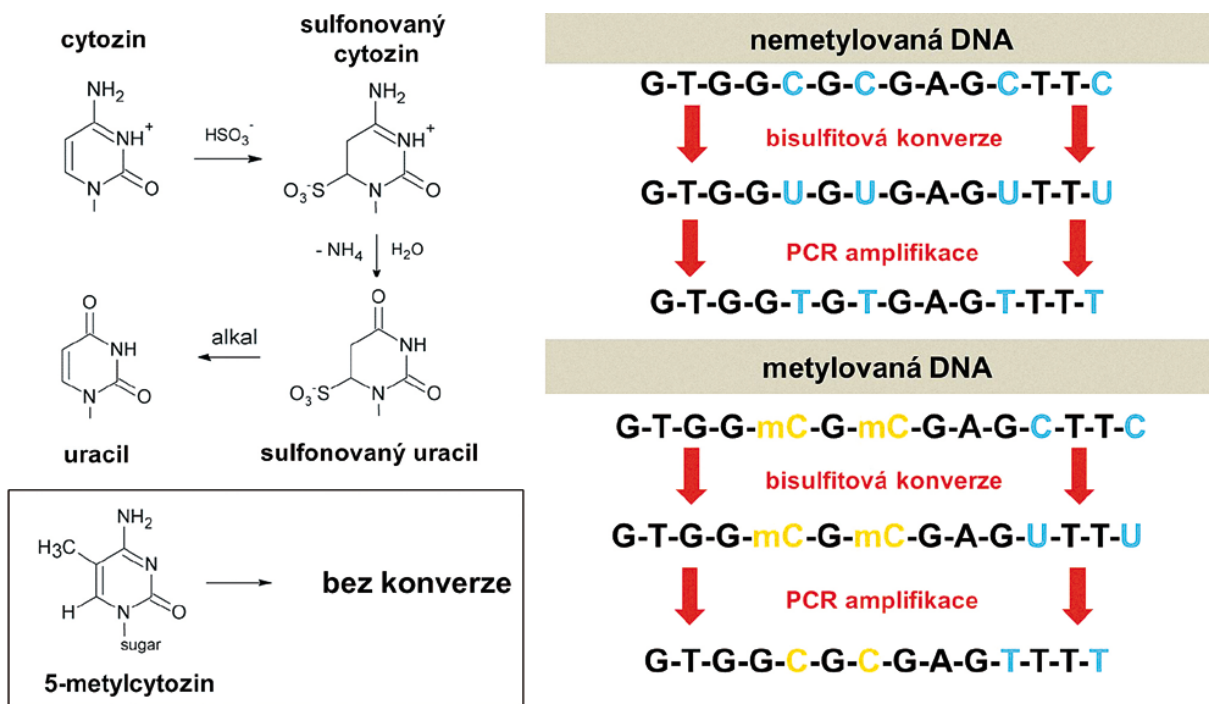
K detekci konkrétních úseků, které se používají při forenzní analýze k odhadu věku, je potřeba nejdříve zjistit metylační vzorec celého genomu (metylom). K tomuto účelu slouží metody jako je například celogenomové bisulfitové sekvenování (WGBS), kdy dojde k bisulfitové sekvenaci celého genomu a na základě toho se vytipují konkrétní lokusy, které vykazují největší korelaci s věkem. Pro forenzní účely se používá několik níže popsanych metod, které jsou již zaměřeny pouze na analýzu těchto konkrétních lokusů.

3.1. Bisulfitová konverze

Prvním krokem bisulfitové konverze je denaturace DNA, tj. rozvolnění dvouvláknové DNA (dsDNA) na jednotlivá vlákna (ssDNA). Přidáním hydrogensířičitanu sodného (NaHSO_3) dojde na ssDNA k přeměně cytosinů na uracil, přičemž metylované cytosiny zůstanou nezměněny (Susan et al., 1994). Metylovaný cytosin se páruje s guaninem a při následné amplifikaci PCR (polymerázovou řetězovou reakcí) je zachován jako cytosin, oproti tomu uracil se páruje s adeninem a namísto původního nemetylovaného cytosinu se objevuje thymin (viz Obrázek 3).

Působením NaHSO_3 , vysoké teploty a nízkého pH dochází při bisulfitové konverzi i k několika nežádoucím účinkům, a to k degradaci DNA, konverzi metylovaného cytosinu na thymin a neúplné konverzi cytosinu. K degradaci DNA dochází depyrimidinačí (Tanaka and Okamoto, 2007), kdy reakcí s NaHSO_3 dochází k porušení N-glykosidické vazby mezi cytosinem nebo thyminem a deoxyribózou, což zapříčiní zlom v DNA vlákne. Těmto nežádoucím reakcím je v omezené míře možné předejít snížením doby trvání bisulfitové konverze (Shiraishi, 2004), kdy je DNA vystavena vysoké koncentraci NaHSO_3 a teplotě 70–90 °C, ale jen po dobu 20–40 minut, oproti předchozím 16–20 hodinám (Frommer et al., 1992). Neúplná konverze cytosinu a konverze cytosinu na thymin může vést

k falešně pozitivním a falešně negativním výsledkům úrovně metylace CpG oblastí. Pro správnou interpretaci se v současnosti využívá zejména přítomnost kontrolního nemetylovaného cytosinu ve zkoumané sekvenci. Pokud je tento cytosin plně konvertován, můžeme předpokládat, že došlo ke zdařilé konverzi i v ostatních pozicích, které korelují s věkem.



Obrázek 3: Nalevo konverze cytosinu na uracil, metylovaný cytosin je nezměněn. Napravo ukázka rozdílu změny původně stejné sekvence DNA po bisulfitové konverzi a PCR amplifikaci, kdy jedna ze sekvence je metylována a druhá nikoli (Bartošík and Ondroušková, 2016)

Přestože 5-metylcytosin (5-mC) zůstává během bisulfitové konverze nezměněn (ojediněle může dojít k jeho přeměně na thymin, především pokud reakce probíhá velmi dlouho), jeho hydroxylovaná varianta 5-hydroxymetylcytosin (5-hmC) se během bisulfitové konverze mění rychle na cytosin-5-metylsulfonát (CMS). CMS obvykle zastavuje DNA polymerázu během PCR, což může zapříčinit, že části DNA, kde se 5-hmC hojně vyskytuje, nebudou zastoupeny ve výsledném PCR produktu (Huang et al., 2010). Vzhledem k tomu, že 5-mC i 5-hmC se amplifikují jako cytosin, je potřeba pro odlišení těchto modifikovaných bází použít oxidativní bisulfitové sekvenování, během kterého se selektivně oxiduje 5-hmC na 5-formylcytosin (5-fC). Během následující bisulfitové konverze dojde k přeměně 5-fC na uracil (Booth et al., 2012).

3.2. Masivně paralelní sekvenování

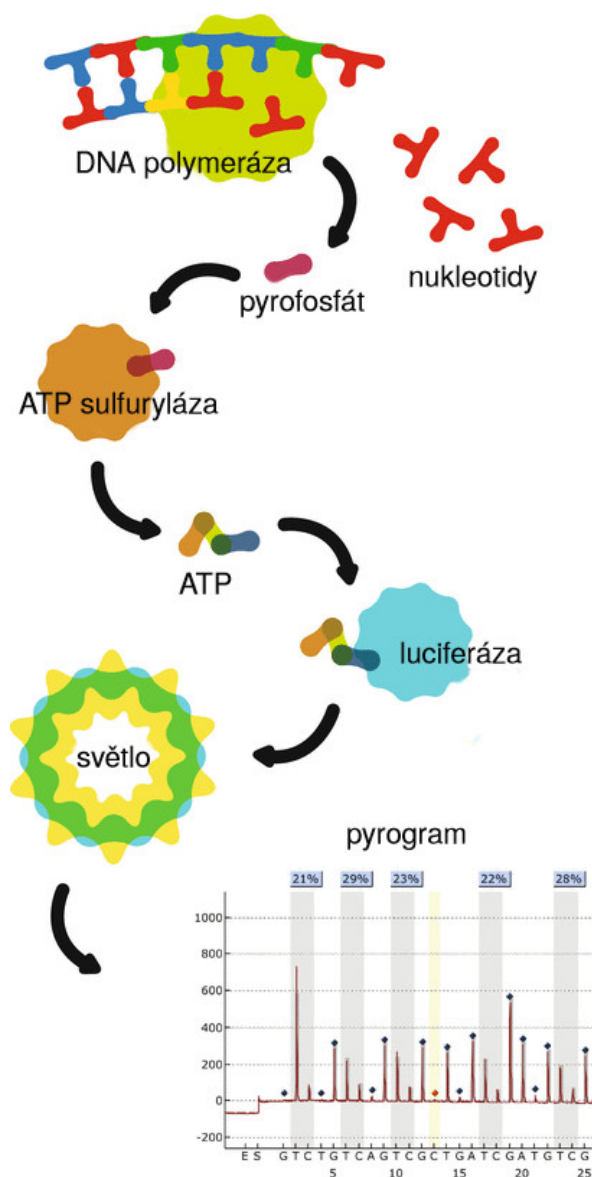
Pod masivně paralelní sekvenování (MPS) spadá mnoho metod, které mají společné to, že oproti starším metodám, jako je pyrosekvenování, umožňují rychlejší sekvenaci většího množství vzorků (stovek až tisíců sekvencí najednou). Metodami MPS můžeme analyzovat celý genom nebo jen jeho části – pro forenzní účely specifické lokusy. Celogenomové bisulfitové sekvenování (WGBS), které se využívá pro zjištění metylomu celého genomu, je pro forenzní účely málo efektivní a finančně náročná metoda, protože ačkoli každý CpG dinukleotid může být teoreticky metylován, v rámci celého genomu dochází k metylaci pouze ve zlomku těchto dinukleotidů (Ziller et al., 2013) a z toho jenom malá část vykazuje korelaci s věkem.

Metody MPS, které byly vyvinuty pro forenzní účely, jsou proto zaměřeny na analýzu krátkých specifických úseků DNA (Fordyce et al., 2015). Z přístrojového vybavení se v současnosti využívají například vysoce automatizované systémy MiSeq nebo Ion Personal Genome Machine (PGM). Lokusy, které jsou analyzovány, projdou nejprve bisulfitovou konverzí, (tak jako u dalších zmiňovaných metod), během které dojde k rozlišení metylovaných a nemetylovaných cytosinů. Na základě následného odlišného párování těchto bází dojde výše uvedenými přístroji MPS k rozlišení úrovně metylace jednotlivých oblastí. PGM systém je metoda založena na polovodičovém systému, kdy se při začlenění nového nukleotidu do vznikajícího vlákna DNA uvolní proton. Tyto protony vytváří změnu v pH okolního roztoku, které jsou zaznamenány senzorem, tento signál je následně proměněn v napětí a digitalizován (Rothberg et al., 2011). MiSeq metoda využívá kamerové detekce fluorescenčního signálu, který je uvolněn při začlenění každého nového nukleotidu a je pro jednotlivé typy nukleotidů charakteristický (Kircher et al., 2009). Vzhledem k tomu, že MiSeq metoda zachycuje signály kamerou, je časově náročnější než PGM systém, ve kterém jsou signály detekovány okamžitě. Obě metody dokáží analyzovat úseky o délce 300–400 bp (párů bází).

3.3. Pyrosekvenování

Během pyrosekvenování dochází k syntéze komplementárního vlákna k templátovému, které je přítomné ve vzorku. Při začlenění každého nového nukleotidu do vznikajícího vlákna DNA je sledem chemických reakcí vyvolán záblesk světla. Vzhledem k tomu, že v reakční směsi je vždy přítomen v danou chvíli pouze jeden z nukleotidů, můžeme pořadím těchto záblesků určit konkrétní sekvenci DNA nově vznikajícího vlákna.

Poněvadž sekvenování probíhá syntézou komplementárního vlákna DNA, je potřeba učinit dsDNA – produkt PCR po bisulfitové konverzi – jednovláknovou. Za tímto účelem je na jednom z primerů navázán biotin. Po dokončení PCR je do reakční směsi přidán streptavidin – protein, který na sebe naváže biotinylovanou DNA a po očištění zůstane v reakční směsi pouze



tato jednovláknová DNA, na které je biotin navázaný (Tost and Gut, 2007). K tomuto templátovému vláknu se díky přítomným primerům a DNA polymeráze syntetizuje komplementární vlákno DNA. Jak je vidět na Obrázku 4, každý nukleotid v čase svého začlenění do nově vznikajícího vlákna uvolní pyrofosfát, který je následně enzymem ATP sulfurylázou přeměněn na adenosintrifosfát (ATP). ATP slouží jako energie pro enzym luciferázu, která katalyzuje přeměnu pigmentu luciferinu na oxoluciferin, jenž vyvolá světelný záblesk. Intenzita světla je přímo úměrná množství začleněných nukleotidů (v jednom momentu je v reakci přítomný pouze jeden typ nukleotidu, může jich být ale začleněno více za sebou). Po každém začlenění daného typu nukleotidu jsou zbylé nukleotidy rozloženy enzymem apyrázou a do reakce je přidán nový typ nukleotidu (Bassil et al., 2013). Z těchto světelných výstupů je vytvořen graf – pyrogram.

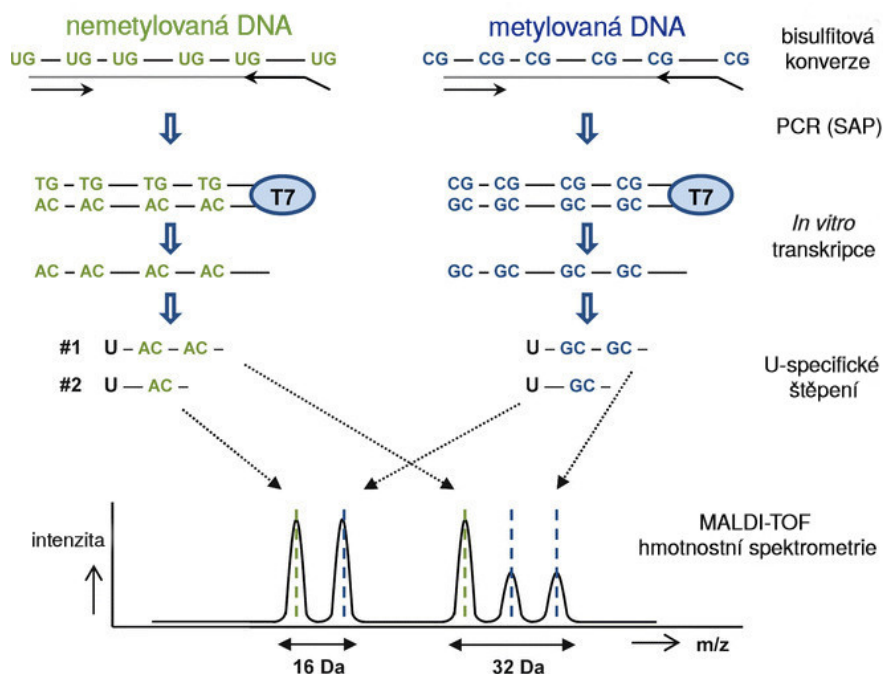
Obrázek 4: Průběh pyrosekvenování. Na pyrogramu je na ose X je vyobrazena sekvence DNA (příčmež E představuje přidání enzymu a S přidání substrátu), která byla analyzována, osa Y reprezentuje intenzitu emitovaného světla. Čísla v modrých rámečcích představují β -hodnotu jednotlivých CpG dinukletidů, tj. poměr metylovaných a nemetylovaných cytosinů, červenou hvězdičkou je označen kontrolní nemetylovaný cytosin (upraveno podle Bassil et al., 2013).

Během pyrosekvenování může být najednou osekvenována sekvence dlouhá přibližně 115 bp (Bassil et al., 2013), což je v porovnání s ostatními metodami relativně málo. Pro forenzní účely je ale tato délka dostačující, vzhledem k tomu, že cílové sekvence pro odhad věku jsou většinou jednotlivé CpG úseky. Zároveň funguje dobře při analýze forenzních vzorků, které se zpravidla vyznačují tím, že obsahují velmi malé množství DNA a/nebo DNA, která je již nějakým způsobem poškozená. Na začátku roku 2020 publikovali Fleckhaus and Schneider (2020) studii, ve které přicházejí s metodou multiplexování (sekvenování více úseků najednou) prostřednictvím pyrosekvenování, během čehož se cílové úseky pre-amplifikují před samotnou PCR. Do této doby byla nevýhodou této metody právě možnost pouze samostatného sekvenování jednotlivých cílových úseků, aby nedocházelo ke ztrátě přesnosti. Šest ze čtrnácti zkoumaných CpG vykazovaly odchylky v měření v porovnání s klasickým pyrosekvenováním, a je tudíž potřeba tyto hodnoty nejprve normalizovat, aby bylo možné výsledky měření použít v predikčních modelech. Pokud se výsledky této studie na větším množství dat potvrdí, mohla by být tato metoda významnou inovací ve forenzní praxi, poněvadž pyrosekvenování patří mezi nejcitlivější sekvenační metody.

3.4. Hmotnostní spektrometrie EpiTYPER

Další metoda, která se využívá pro detekci metylované DNA, je EpiTYPER. EpiTYPER je založen na kvantitativní analýze metylovaných CpG oblastí pomocí hmotnostního spektrometru. Před vlastní analýzou projde DNA bisulfitovou konverzí a následnou PCR, kdy se amplifikuje pomocí primerů, na kterých je navázán T7 promotor (Kunze, 2018). Tento promotor funguje po dokončení PCR a následujícím očištěním shrimp alkalickou fosfatázou (SAP) od nezačleněných DNA nukleotidů jako DNA dependentní RNA polymeráza – enzym, který syntetizuje RNA podle DNA předlohy. Výsledný produkt je tedy jednovláknová RNA, jenž je specificky rozštěpena enzymem RNázou A vždy za uracilem. Tímto vzniknou různě dlouhé RNA fragmenty, které jsou ionizovány a putují elektrickým polem směrem k detektoru. Čím je fragment delší, a tedy i těžší, tím déle mu trvá, než se k detektoru dostane. Fragment korespondující s metylovaným CpG dinukleotidem v DNA bude o 16 Daltonů těžší, než když metylován nebyl. β -hodnota daného CpG dinukleotidu se poté určí poměrem plochy píku metylovaného fragmentu k celkové ploše metylovaného i nemetylovaného píku fragmentu (Suchiman et al., 2015). Tento postup je shrnut na Obrázku 5, kdy v dolní části vidíme výsledek

analýzy hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, během které se fragmenty ionizují laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s detektorem doby letu. EpiTYPER je rychlá a přesná metoda, během které se sekvenuje úsek dlouhý 100–600 bp (Suchiman et al., 2015), avšak v případě přítomnosti více stejně velkých fragmentů nebo fragmentů příliš malé nebo příliš velké velikosti může dojít k tomu, že je metoda nezachytí. Oproti pyrosekvenování se během této metody může analyzovat velké množství vzorků najednou.



Obrázek 5: Průběh metody EpiTYPER. Osa X označuje poměr hmotnosti k náboji (m/z) a osa Y intenzitu iontů. Modře jsou vyznačeny píky metylovaných fragmentů DNA, zeleně nemetylovaných (upraveno podle Kunze, 2018).

3.5. Minisekvenování SNaPshot

Metoda SNaPshot porovnává poměr metylovaných a nemetylovaných cytosinů metodou jedno-bázové extenze (SBE) – prodloužením primerů komplementárních k templátovému vláknu DNA o jednu bázi. Tyto primery jsou komplementární k místům na DNA, které jsou přilehlé k jednotlivým CpG úsekům. SNaPshot je nazván podle zkratky SNP, která označuje jednonukleotidový polymorfismus. V tomto případě SNP označuje variaci v cytosinu, který může být metylovaný (a je i po bisulfitové konverzi amplifikován stále jako cytosin) nebo nemetylovaný (v tom případě je po bisulfitové konverzi amplifikován jako thymin).

Primer je prodloužen vždy právě o jednu bázi ve formě fluorescenčně značeného dideoxyribonukleotid trifosfátu (ddNTP) – uměle upraveného nukleotidu, kterému byla odebrána OH skupina na 3' uhlíku. Kvůli absenci této OH skupiny není umožněno navázání dalšího nukleotidu a syntéza nového vlákna je zastavena. Tyto primery prodloužené o jeden ddNTP jsou analyzovány kapilární elektroforézou, během čehož jsou jednotlivé úseky rozděleny podle své velikosti a dochází k detekci rozdílné intenzity jejich fluorescence (Kaminsky and Petronis, 2009). Je důležité, aby primery byly komplementární k sekvenci, která v sobě neobsahuje pokud možno žádný polymorfismus. V případě, že by tomu tak bylo (například vlivem toho, že by v sekvenci komplementární k primeru byly různě metylované jiné CpG úseky), by primer nenasedl na templátové vlákno správně a mohlo by dojít k nesprávné detekci poměru metylovaných a nemetylovaných cytosinů v cílových sekvencích (Kaminsky, 2005). Metoda SNaPshot umožňuje analýzu více úseků najednou, a to až několik desítek (Fondevila et al., 2013).

4. Odhad věku na základě metylace DNA pro forenzní účely

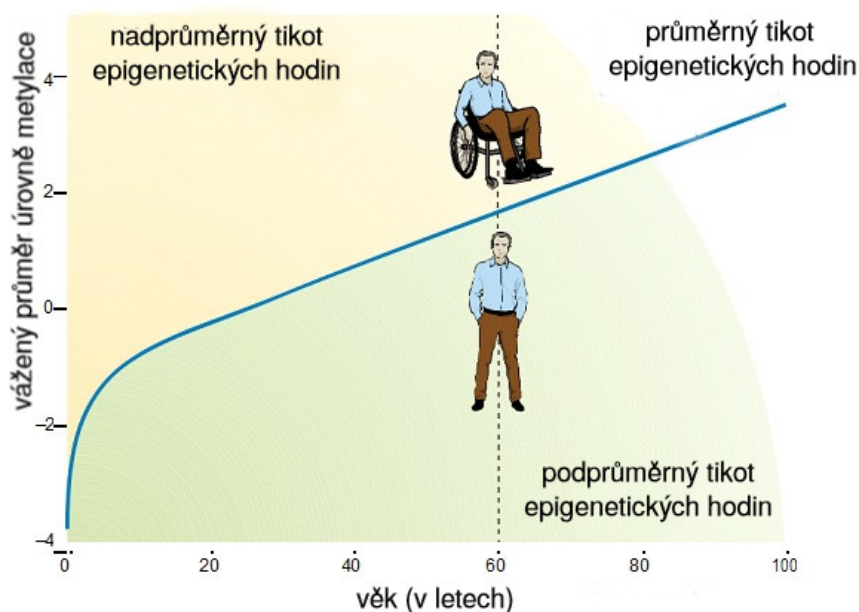
4.1. Modely pro odhad věku

Modely pro odhad věku můžeme rozdělit na multi-tkáňové a tkáňově specifické. Níže popsany multi-tkáňový Horvathův model je relativně velmi přesný, avšak své uplatnění nachází pouze v případech, kdy je k dispozici velké množství kvalitního vzorku DNA. V kriminalistické forenzní praxi najdou své využití spíše tkáňově specifické modely, které jsou založeny na analýze jen několika málo CpG oblastí. Vzorky DNA, se kterými se pracuje, se často nachází v různých stupních degradace, a Horvathův model, založený na zkoumání několika stovek CpG, proto není pro jejich analýzu vhodný. Pro použití správného tkáňově specifického modelu musí být tkáň obsažená ve vzorku nejprve identifikována. Je důležité brát v potaz, že vzorek může obsahovat i více typů tkání, což může ovlivnit výsledný odhad věku, jelikož CpG úseky vykazující vysokou korelaci s věkem v jedné tkáni mohou vykazovat korelaci podstatně menší v tkáni odlišné (Horvath, 2013).

4.1.1. Horvathův model pro odhad věku

Horvath (2013) vytvořil jako první multi-tkáňový predikční model (Horvathovy epigenetické hodiny) na základě analýzy 8 000 vzorků z celkem 51 tkání a buněčných typů jedinců napříč všemi věkovými kategoriemi. Z těchto vzorků vybral 353 CpG dinukleotidů, ze kterých 193 vykazovalo hypermetylaci se zvyšujícím se věkem a zbylých 160 hypometylaci. Horvath analyzoval β -hodnotu všech 353 CpG oblastí – jednotlivé CpG samy o sobě většinou nemají statisticky vypovídající hodnotu, ale souhrnně vykazují vysokou korelaci s chronologickým věkem s odchylkou 3,6 let. Z těchto β -hodnot je vytvořena kalibrační funkce. Jak je vidět na Obrázku 6, tato kalibrační funkce (rychlost tikotu epigenetických hodin) není konstantní. K nejrychlejšímu nárůstu dochází v prvních několika letech lidského života a postupně se tikot zpomaluje až do přibližně 20 let. Od dospělého věku poté dochází k tikotu konstantní rychlostí. Na Obrázku 6 je dále znázorněno, jak dva jedinci stejného chronologického věku mohou vykazovat rozdíly ve věku epigenetickém. Horvathův model je dodnes využíván nejen ve forenzním, ale i v medicínském odvětví (např. při výzkumu neurodegenerace (Levine et al., 2015)). Novější studie El Khoury et al. (2019) upozorňuje na to, že v Horvathově

modelu dochází systematicky k podhodnocování odhadovaného věku vzorků starších lidí, nejspíše kvůli relativně malému zastoupení starší věkové kategorie v Horvathově studii.



Obrázek 6: Závislost tikotu Horvathových epigenetických hodin na chronologickém věku (upraveno podle Horvath and Raj, 2018)

4.1.2. Tkáňově specifické modely pro odhad věku

V posledním desetiletí došlo k vývinu mnoha tkáňově specifických predikčních modelů pro různé typy tkání a buněčných linií, se kterými se setkáváme ve forenzní analýze. Mezi ně patří zejména krev, sliny, buňky získané bukalním stěrem, ejakulát a zuby. Tyto predikční modely založené na několika jednotlivých CpG byly zpravidla vyvinuty na základě dřívějších modelů obsahujících několik desítek až stovek těchto úseků, ze kterých byly vytipovány jednotky CpG, které v konkrétní tkáni nejvíce korelovaly s věkem.

Při vývinu nového modelu se zpravidla postupuje tak, že se vzorky rozdělí na dvě části, a to na testovací a trénovací vzorek. Z trénovacího vzorku obsahujícího data s množstvím proměnných se pomocí lineární regrese sestaví funkce, která je složena z množiny regresních koeficientů a poté se měří odchylka skutečných hodnot od této funkce. Na testovacím vzorku se následně testuje přesnost vytvořeného modelu.

Níže jsou uvedeny vybrané modely ke každému výše zmíněnému typu tkáně.

4.1.2.1. Modely pro analýzu krve

Nejvíce modelů je prozatím založeno na analýze krve, ve které se jako nejpřesnější marker jeví některé CpG úseky v genu *ELOVL2* (Correia Dias et al., 2020; Park et al., 2016; Zbieć-Piekarska et al., 2015a, 2015b). Pouze na základě analýzy 7 CpG tohoto genu Zbieć-Piekarska et al. (2015a) vytypovali 2 z nich, které vykazovaly největší korelaci s věkem a dohromady vytvořily základ pro vytvoření modelu s úspěšností odhadu ± 7 let. Autoři tohoto modelu později zpřesnili tyto výsledky přidáním čtyř dalších CpG úseků v genech *C1orf132*, *TRIM59*, *KLF14*, a *FHL2*, přičemž z genu *ELOVL2* analyzovali už pouze jeden úsek. Z těchto pěti CpG úseků vytvořili model z 300 krevních vzorků odebraných od jedinců ve věku 2–75 let, kdy se odhadovaný věk lišil od toho skutečného s průměrnou odchylkou 3,4 let v trénovacím setu a 3,9 let v testovacím setu vzorků. Přesnost tohoto modelu byla podstatně nižší u jedinců nad 60 let, kdy docházelo ke zkreslení výsledků nejspíše vlivem epigenetického driftu (Zbieć-Piekarska et al., 2015b). Autoři vyzorovali také malé rozdíly mezi přesností odhadu věku na základě pohlaví. U žen dosahovala průměrná odchylka 3,7 let, přičemž u mužů docházelo k odhadu vyššího věku, než byl ten skutečný a odchylka činila 4,0 let.

Park et al. (2016) pracovali oproti předchozímu modelu testovanému na vzorcích evropského obyvatelstva (konkrétně jedinců z Polska) na vývinu predikčního modelu, který je založen na krevních vzorcích získaných od dárců z Jižní Koreje. Ze všech odlišně metylovaných oblastí souvisejících s věkem vybrali tři z nich, které u asijských jedinců vykazovaly největší korelaci s věkem. Mezi ně patřil stejně jako v předchozích uvedených studiích

Zbieć-Piekarské et al. CpG úsek v oblasti genu *ELOVL2*, zbylé dva (*ZNF423* a *CCDC102B*) se ale lišily. Na základě tohoto modelu vyšla průměrná odchylka v trénovacím setu o něco vyšší, než ve výše uvedené studii Zbieć-Piekarska et al. (2015b), a to 6,3 let u trénovacího setu a 3,2 let u testovacího setu vzorků. I zde se opakoval trend snižující se přesnosti odhadu u seniorů starších 60 let.

Vzhledem k tomu, že ve vzorcích, ze kterých byly sestavovány predikční modely, byl často menší podíl dětí a dospívajících oproti plnoletým jedincům, rozhodli se Freire-Aradas et al. (2018) vytvořit model čistě ze vzorků 180 jedinců mladších 18 let. Vytypovali celkem šest genů obsahujících CpG úseky, které nejvíce korelovaly s jejich věkem, z nichž se jeví jako nejpřesnější CpG úseky v genu *KCNAB3*. V tomto genu vyzorovali markantní rozdíly

v metylaci CpG úseků u všech jedinců od 2 let věku až do 18 let. V dospělosti již metylační změny těchto CpG úseků nezaznamenali, což naznačuje, že by gen *KCNAB3* mohl být unikátním markerem právě pro nepnoleté jedince.

Pět již dříve ověřených vysoce korelujících CpG úseků s věkem genů *ELOVL2*, *EDARADD*, *PDE4C*, *FHL2* a *C1orf132* analyzovali Correia Dias et al. (2020) na 51 vzorcích krve jedinců zemřelých ve věku 24–86 let. Ze všech úseků vyšel jako nejpřesnější marker CpG úsek v genu *ELOVL2*. Průměrná odchylka trénovacího setu vyšla 6,08 let a testovacího 8,84 let, což je znatelně více než v předchozích modelech živých dárců. Zda za těmito rozdíly stojí vnější vlivy, které působily na epigenetický věk, nebo zda se epigenetický věk mění nějakým způsobem i po smrti, zatím není známo.

Výhodou krevní tkáně jakožto materiálu pro forenzní analýzu je relativně velké množství DNA na jednotku objemu díky množství bílých krvinek, takže je možné provést analýzu i z jejího menšího množství, což lze využít pro krevní stopy zajištěné na místě činu. Pokud ovšem potřebujeme odebrat biologický materiál zájmové osobě, tak u odběru krve se jedná o relativně invazivní zákrok. Z tohoto hlediska je tudíž daleko vhodnější bukální stěr neb sliny, jejichž odběr je jednoduchý, rychlý, bezpečný a nevyžaduje přítomnost zdravotnického personálu.

4.1.2.2. Modely pro analýzu slin a bukálních stěrů

Co se týče modelů pro odhad věku ze vzorků bukálního stěru, je zajímavá studie Eipel et al. (2017). Zde autoři nejprve vytvořili predikční model ze tří CpG úseků v genech *PDE4C*, *ASPA* a *ITGA2B*, kdy odchylka představovala rozdíl od chronologického věku 4,3 let v trénovacím vzorku a 7,03 let v testovacím. V každém vzorku bukálního stěru se ale vyskytuje jiný poměr epiteliálních buněk a leukocytů, přičemž oba typy buněk vykazují odlišný epigenetický vzorec. Proto autoři zahrnuli do modelu i dva CpG markery, přičemž jeden z nich je vždy specifický pro určitý typ buněk. Tímto vylepšením model zpřesnili a výsledná odchylka se snížila na 5,09 a 5,12 let. Dále také provedli kontrolu, zda některý z použitých markerů vykazoval odlišnou metylaci na základě toho, zda jedinci, kterým byly vzorky odebrány, kouřili, nebo zda se metylace lišila na základě jejich příslušnosti k etnické skupině či jejich pohlaví. Ani jeden z těchto předpokladů nebyl potvrzen, jelikož nebyly mezi vzorky vyzkoušeny žádné signifikantní rozdíly ovlivněné některým z uvedených faktorů.

Hong et al. (2017) vytvořili model pro odhad věku z analýzy sedmi CpG markerů, a to v genech *SST*, *CNGA3*, *KLF14*, *TSSK6*, *TBR1*, *SLC12A5* a *PTPN7*. Poslední zmíněný je buněčně specifický marker pro lymfocyty. Výsledkem tohoto modelu založeném na 52 vzorcích slin byla odchylka od chronologického věku v trénovacím vzorku pouze 3,13 let a v testovacím 3,15 let. Při sestavení modelu bez buněčně specifického markeru dosahovala odchylka 4,1 let, což dokazuje, jak výraznému zpřesnění došlo jeho zahrnutím do modelu.

4.1.2.3. Modely pro analýzu ejakulátu

Lee et al. (2015) navrhli jako první predikční model na základě analýzy ejakulátu. Ve své studii vycházeli pouze z 12 vzorků, ze kterých vytypovali 3 nejrelevantnější CpG úseky, z nichž vyšel jako nej přesnější CpG úsek v genu *TTC7B*. Odhadovaný věk byl určen s odchylkou přibližně 5 let, což představuje slibný základ pro nadcházející modely. Tento model byl ověřen Lee et al. (2018), nejenom analýzou více vzorků od dárců, ale i analýzou skutečných forezních vzorků, které byly uchovávané v rozmezí od 3 měsíců do 17 let. Kvalitu markeru v genu *TTC7B* potvrzuje i Li et al. (2017), kteří pomocí pouze tohoto jediného CpG úseku byli schopni odhadnout věk 38 čínských Chanů ve věku od 21 do 54 let s odchylkou 4,05 let.

4.1.2.4. Modely pro analýzu zubů

Pro forezní praxi může být v neposlední řadě užitečný také odhad věku analýzou zubní tkáně. Bekaert et al. (2015) použili dříve ověřené markery pro krevní vzorky v genech *ASPA*, *PDE4C*, *ELOVL2* a *EDARADD*. Tyto markery použili také pro analýzu 29 vzorků dentinu od jedinců starých 19–70 let. Odchylka od chronologického věku se pohybovala v rozmezí $\pm 4,86$ let, což se dá považovat za velmi dobrý výsledek, vzhledem k tomu, že tyto markery byly vytypovány na základě analýzy krve (krevní vzorky v této studii vykazovaly odchylku $\pm 3,75$ let) a také kvůli tomu, že se dentin skládá převážně z anorganických látek. Giuliani et al. (2016) analyzovali celkem 3 CpG úseky genů *ELOVL2*, *FHL2* a *PENK* ve vzorcích nejenom dentinu, ale i zubního cementu a dřene. Vzorky byly od 22 jedinců ve věku 17–77 let a nejlepších výsledků dosáhla analýza kombinace zubní dřene a cementu, kdy se oba vzorky testovaly dohromady. Odchylka v tomto případě dosahovala pouze 1,20 let.

Odhad věku na základě zubní tkáně je z povahy materiálu vhodný na rozdíl od výše uvedených tkání zejména u případů, kdy je třeba posoudit věk zemřelého. Vzhledem k tomu,

že jsou zuby odolné vůči dekompozici, může být jejich analýza provedena i dlouhou dobu po úmrtí.

4.2. Vliv vnějších faktorů na epigenetický věk

Epigenetický věk se liší od chronologického v závislosti na životním stylu, stravě, fyzické aktivitě a genetických predispozicích a může být použit pro odhad délky života a míry rizika onemocnění různými chorobami (Chen et al., 2016). Je tedy důležité, aby byly tyto změny brány v potaz při sestavování predikčních modelů a jejich vyhodnocování, protože úroveň metylace jednotlivých CpG úseků se může lišit v závislosti na nejrůznějších vnějších faktorech. Níže jsou uvedeny vybrané studie, které ukazují konkrétní odlišnosti v rychlosti epigenetických hodin na základě různých proměnných.

Spólnicka et al. (2018) analyzovali 5 CpG markerů (*ELOVL2*, *MIR29B2C*, *FHL2*, *TRIM59* a *KLF14*) u vrcholových sportovců, přičemž u dvou z nich, *TRIM59* a *KLF14*, vyzorovali zvýšenou metylaci v porovnání s kontrolním vzorkem. Pozoruhodné je, že tyto změny znamenají zrychlené epigenetické stárnutí, což by bylo v rozporu s tím, že na základě mnoha studií (např. Garatachea et al., 2014; Farahmand et al., 2009) dosahují vrcholoví sportovci delší střední délky života, než jedinci, kteří se vrcholové sportovní aktivitě nevěnují. Vysvětlení se pravděpodobně nachází v tom, že hypermetylace v těchto úsecích zároveň zeslabuje transkripci těchto genů, což v důsledku znamená snížené riziko zánětlivých a rakovinných procesů, která pozitivně ovlivňuje délku života (Spólnicka et al., 2018).

Weidner et al. (2014) vyzorovali při vyhodnocování modelu ze 141 vzorků krve vytvořeného na základě 3 CpG markerů (*ITGA2B*, *ASPA* a *PDE4C*) zvýšený odhad věku u obézních lidí s indexem tělesné hmotnosti (BMI) vyšším než 30 oproti ostatním jedincům. Ve stejném roce Horvath et al. (2014) provedli analýzu epigenetického věku u několika tkání, a to krevní, svalové, tukové a jaterní ve vztahu k BMI. U buněk krve, svalů a tuku nevyzorovali v závislosti na zvyšujícím se BMI signifikantní rozdíly, ovšem u jaterních buněk docházelo ke zvyšujícímu se epigenetickému věku v průměru o 3,3 let s každými deseti přibývajících jednotkami BMI nad optimální rozmezí. Dvacet jedna obézních jedinců poté podstoupilo bandáž žaludku a díky tomu podstatně snížili svoji hmotnost – v průměru o 14,6 jednotek BMI. Autoři poté porovnali epigenetický věk jejich jaterních buněk

s předchozími hodnotami, avšak nevypozorovali žádné změny. Mezi oběma měřeními uběhlo devět měsíců, tudíž není vyloučené, že ve větším časovém rozpětí by ke změnám mohlo dojít.

Ukazuje se, že nejen fyzický, ale i psychický trénink ovlivňuje naše epigenetické hodiny. Pravidelnou meditací můžeme dle Chaix et al. (2017) tyto hodiny zpomalit. V této studii při porovnání 353 CpG markerů podle Horvathova modelu u skupin dvou věkových kategorií (do 52 let a 52+) docházelo s přibývajícím věkem k signifikantním rozdílům v epigenetických hodinách u kontrolní skupiny nepraktikující mediaci, avšak u meditujících jedinců (praktikujících denně alespoň 30 minut a více než 3 roky) k těmto změnám vlivem stárnutí nedochází.

4.3. Mezipopulační rozdíly v metylaci DNA

Studie provedená na amerických občanech, kteří byli kavkazského, afrického a čínského původu objevila u všech těchto populací množství odlišně metylovaných CpG oblastí. Dvě třetiny z těchto oblastí mají vliv na fenotyp populací, např. na náchylnost k určitým onemocněním, odlišné reakce na různé léky a faktory prostředí (znečištění ovzduší atp.), u třetiny z nich nebyl zjištěn vliv na genetickou variabilitu. Nepodařilo se ovšem prokázat, že by jakákoli z těchto odlišně metylovaných oblastí patřila mezi metylované oblasti související s věkem (aDMRs) (Heyn et al., 2013).

Pozdější studie, např. Fleckhaus et al. (2017) docházejí závěru, že i aDMRs se na základě geografického původu od sebe mohou lišit. Autoři provedli analýzu vzorků získaných bukalním stěrem u přibližně 50 jedinců pocházejících ze třech různých geografických oblastí, a to střední Evropy, Blízkého Východu a západní Afriky. Při analýze pěti CpG úseků (konkrétně v genech *ASPA*, *ITGA2B*, *PDE4C* a dvou úseků v genu *ELOVL2*) zjistili, že způsob, jakým se měnila celková metylace s přibývajícím věkem, byl u všech populací velmi podobný, avšak byl zaznamenán rozdíl v rozptylu hodnot metylace u jednotlivých CpG markerů mezi jednotlivými populacemi. Nejmenší rozptyl v hodnotách vykazovaly vzorky odebrané od jedinců z Blízkého Východu (a tudíž jejich odhadovaný věk byl nejpřesnější) a následně se zvyšoval přes hodnoty jedinců ze střední Evropy až k jedincům ze západní Afriky. Výsledky ukazují, že pro forenzní užití bude pravděpodobně vhodné zahrnutí i biogeografických markerů, nicméně vzhledem k relativně malému počtu použitých vzorků je třeba ještě dalších studií, které by tento trend potvrdily.

Vzhledem k tomu, že se většina studií soustředí na analýzu populací z průmyslových společností, Gopalan et al. (2017) provedli analýzu metylace DNA u lovecko-sběračských populací – Baka žijící v deštném pralese střední Afriky a #Khomani San z pouště Kalahari v jižní Africe. V této studii analyzovali stovky CpG oblastí, u kterých byla objevena korelace s věkem v závislosti na jejich metylaci, a porovnávali úroveň metylace těchto CpG oblastí u jedinců populací Baka a #Khomani San s předchozími studii prováděnými na jedincích z industriální společnosti. Ze všech těchto CpG oblastí se ukázal jako nejuniverzálnější ukazatel aDMR v promotoru genu *ELOVL2* (jeho metylační vzorec se měnil v závislosti na věku u všech populací nejpodobněji), stejně jako ve výše uvedených studiích provedených na jedincích z průmyslových společností. Provedli také analýzu 353 CpG markerů podle Horvathova modelu, kdy nejpřesnějšího výsledku dosahovaly vzorky ze slin osob z populace Baka (medián odchylky odhadovaného věku od chronologického vyšel 3,90 let), u populace #Khomani San medián odchylky dosahoval 6,01 let. Tento rozdíl je nejpravděpodobněji zapříčiněn tím, že z #Khomani San byl vybrán značně starší vzorek populace (medián věku ve vzorku byl 62, oproti mediánu 30 u Baka) – autoři totiž vyzorovali podobný trend v odchylce odhadovaného věku oproti chronologickému i u starších lidí evropské populace, což je také v souladu se studii zmíněnými v předchozích kapitolách.

5. Závěr

Odhad věku na základě metylace DNA představuje velmi komplexní proces, který je stále předmětem intenzivního výzkumu. Metylační změny v DNA probíhají v průběhu celého života, přičemž k největším změnám dochází v raném vývoji a rychlost těchto změn se zpomaluje až do dosažení dospělosti, během které ke změnám dochází přibližně konstantní rychlostí. Toto tempo se opět zrychluje v seniorském věku, kdy přibývá náhodných změn v metylaci – dochází k epigenetickému driftu. Metylace DNA se nemění pouze s přibývajícím věkem, ale ovlivňují ji i různorodé vnější faktory a také biogeografický původ jedinců. I přes to, že je úroveň metylace DNA také odlišná v jednotlivých typech tkání, studie ukazují, že při výběru těch správných (mnohdy tkáňově specifických) lokusů lze sestavit predikční modely pro všechny výše uvedené typy tkání.

Do této doby již došlo k vývinu mnoha relativně přesných modelů pro forenzní účely především u dospělých jedinců. Specifickými kategoriemi jsou děti a senioři, u kterých byly zaznamenány větší odchylky od skutečného věku při použití těchto modelů, a je tedy zapotřebí vyvinout modely takové, které zohledňují odlišnou fázi vývoje jejich metylomu.

Pro analýzu konkrétních lokusů metylomu, na základě kterých lze odhadovat věk, bylo dodnes vyvinuto několik různých laboratorních metod. Každá z nich má svá specifická úskalí (citlivost, maximální délku DNA, kterou je schopná detekovat, časovou a finanční náročnost) a v praxi je tedy výběr správné metody klíčový.

V rámci výzkumu vědci dochází stále k novým poznatkům a objevování dalších proměnných, které mají nebo by mohly mít dopad na výsledný odhad věku. Studie jsou ovšem často prováděny na menších vzorcích populace a je zapotřebí dalšího výzkumu ve větším měřítku na co možná nejvariabilnějším vzorku populací. Postupně ale dochází ke zpřesnění predikčních modelů a dá se tedy předpokládat, že zjišťování chronologického věku člověka na základě analýzy metylace DNA by se mohlo v budoucnu začít používat také v každodenní forenzní praxi.

6. Seznam literatury

- Ambrosi, C., Manzo, M., Baubec, T., 2017. Dynamics and Context-Dependent Roles of DNA Methylation. *J. Mol. Biol.* 429, 1459–1475.
- Bartošík, M., Ondroušková, E., 2016. Novel Approaches in DNA Methylation Studies – MS-HRM Analysis and Electrochemistry. *Klin. Onkol.* 29, 4S64-4S71.
- Bassil, C.F., Huang, Z., Murphy, S.K., 2013. Bisulfite Pyrosequencing, in: Malek, A., Tchernitsa, O. (Eds.), *Ovarian Cancer, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 95–107.
- Bekaert, B., Kamalandua, A., Zapico, S.C., Van de Voorde, W., Decorte, R., 2015. Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics* 10, 922–930.
- Bell, J.T., Tsai, P.C., Yang, T.-P., Pidsley, R., Nisbet, J., Glass, D., Mangino, M., Zhai, G., Zhang, F., Valdes, A., Shin, S.-Y., Dempster, E.L., Murray, R.M., Grundberg, E., Hedman, A.K., Nica, A., Small, K.S., The MuTHER Consortium, Dermitzakis, E.T., McCarthy, M.I., Mill, J., Spector, T.D., Deloukas, P., 2012. Epigenome-Wide Scans Identify Differentially Methylated Regions for Age and Age-Related Phenotypes in a Healthy Ageing Population. *PLoS Genet.* 8, e1002629.
- Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R., Ingram, V., 1988. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. *J. Mol. Biol.* 203, 971–983.
- Bochtler, M., Kolano, A., Xu, G.-L., 2017. DNA demethylation pathways: Additional players and regulators. *BioEssays* 39, e201600178.
- Booth, M.J., Branco, M.R., Ficz, G., Oxley, D., Krueger, F., Reik, W., Balasubramanian, S., 2012. Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution. *Science* 336, 934–937.
- Chaix, R., Alvarez-López, M.J., Fagny, M., Lemee, L., Regnault, B., Davidson, R.J., Lutz, A., Kaliman, P., 2017. Epigenetic clock analysis in long-term meditators. *Psychoneuroendocrinology* 85, 210–214.
- Chedin, F., Lieber, M.R., Hsieh, C.-L., 2002. The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 16916–16921.
- Chen, B.H., Marioni, R.E., Colicino, E., Peters, M.J., Ward-Caviness, C.K., Tsai, P.-C., Roetker, N.S., Just, A.C., Demerath, E.W., Guan, W., Bressler, J., Fornage, M., Studenski, S., Vandiver, A.R., Moore, A.Z., Tanaka, T., Kiel, D.P., Liang, L., Vokonas, P., Schwartz, J., Lunetta, K.L., Murabito, J.M., Bandinelli, S., Hernandez, D.G., Melzer, D., Nalls, M., Pilling, L.C., Price, T.R., Singleton, A.B., Gieger, C., Holle, R., Kretschmer, A., Kronenberg, F., Kunze, S., Linseisen, J., Meisinger, C., Rathmann, W., Waldenberger, M., Visscher, P.M., Shah, S., Wray, N.R., McRae, A.F., Franco, O.H., Hofman, A., Uitterlinden, A.G., Absher, D., Assimes, T., Levine, M.E., Lu, A.T., Tsao, P.S., Hou, L., Manson, J.E., Carty, C.L., LaCroix, A.Z., Reiner, A.P., Spector, T.D., Feinberg, A.P., Levy, D., Baccarelli, A., van Meurs, J., Bell, J.T., Peters, A., Deary, I.J., Pankow, J.S., Ferrucci, L., Horvath, S., 2016. DNA methylation-based measures of biological age: meta-analysis predicting time to death. *Aging* 8, 1844–1865.
- Conerly, M., Grady, W.M., 2010. Insights into the role of DNA methylation in disease through the use of mouse models. *Dis. Model. Mech.* 3, 290–297.

- Correia Dias, H., Cordeiro, C., Corte Real, F., Cunha, E., Manco, L., 2020. Age Estimation Based on DNA Methylation Using Blood Samples From Deceased Individuals. *J. Forensic Sci.* 65, 465–470.
- Cortellino, S., Xu, J., Sannai, M., Moore, R., Caretti, E., Cigliano, A., Le Coz, M., Devarajan, K., Wessels, A., Soprano, D., Abramowitz, L.K., Bartolomei, M.S., Rambow, F., Bassi, M.R., Bruno, T., Fanciulli, M., Renner, C., Klein-Szanto, A.J., Matsumoto, Y., Kobi, D., Davidson, I., Alberti, C., Larue, L., Bellacosa, A., 2011. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* 146, 67–79.
- Deaton, A.M., Bird, A., 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 25, 1010–1022.
- Eipel, M., Mayer, F., Arent, T., P., M., Birkhofer, C., Gerstenmaier, U., Costa, I., Ritz-Timme, S., Wagner, W., 2017. Epigenetic age predictions based on buccal swabs are more precise in combination with cell type-specific DNA methylation signatures. *Aging* 8, 1034–1048.
- El Khoury, L.Y., Gorrie-Stone, T., Smart, M., Hughes, A., Bao, Y., Andrayas, A., Burrage, J., Hannon, E., Kumari, M., Mill, J., Schalkwyk, L.C., 2019. Systematic underestimation of the epigenetic clock and age acceleration in older subjects. *Genome Biol.* 20, 283.
- Farahmand, B., Broman, G., de Faire, U., Vågerö, D., Ahlbom, A., 2009. Golf: a game of life and death - reduced mortality in Swedish golf players. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 19, 419–424.
- Fleckhaus, J., Freire-Aradas, A., Rothschild, M.A., Schneider, P.M., 2017. Impact of genetic ancestry on chronological age prediction using DNA methylation analysis. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 6, e399–e400.
- Fleckhaus, J., Schneider, P.M., 2020. Novel multiplex strategy for DNA methylation-based age prediction from small amounts of DNA via Pyrosequencing. *Forensic Sci. Int. Genet.* 44, 102189.
- Fondevila, M., Phillips, C., Santos, C., Freire Aradas, A., Vallone, P.M., Butler, J.M., Lareu, M.V., Carracedo, Á., 2013. Revision of the SNPforID 34-plex forensic ancestry test: Assay enhancements, standard reference sample genotypes and extended population studies. *Forensic Sci. Int. Genet.* 7, 63–74.
- Fordyce, S.L., Mogensen, H.S., Børsting, C., Lagacé, R.E., Chang, C.-W., Rajagopalan, N., Morling, N., 2015. Second-generation sequencing of forensic STRs using the Ion Torrent™ HID STR 10-plex and the Ion PGM™. *Forensic Sci. Int. Genet.* 14, 132–140.
- Freire-Aradas, A., Phillips, C., Girón-Santamaría, L., Mosquera-Miguel, A., Gómez-Tato, A., Casares de Cal, M.Á., Álvarez-Dios, J., Lareu, M.V., 2018. Tracking age-correlated DNA methylation markers in the young. *Forensic Sci. Int. Genet.* 36, 50–59.
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., Paul, C.L., 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 1827–1831.
- Garatachea, N., Santos-Lozano, A., Sanchis-Gomar, F., Fiuza-Luces, C., Pareja-Galeano, H., Emanuele, E., Lucia, A., 2014. Elite Athletes Live Longer Than the General Population: A Meta-Analysis. *Mayo Clin. Proc.* 89, 1195–1200.
- Giuliani, C., Cilli, E., Bacalini, M.G., Pirazzini, C., Sazzini, M., Gruppioni, G., Franceschi, C., Garagnani, P., Luiselli, D., 2016. Inferring chronological age from DNA methylation patterns of human teeth. *Am. J. Phys. Anthropol.* 159, 585–595.

- Gopalan, S., Carja, O., Fagny, M., Patin, E., Myrick, J.W., McEwen, L.M., Mah, S.M., Kobor, M.S., Froment, A., Feldman, M.W., Quintana-Murci, L., Henn, B.M., 2017. Trends in DNA Methylation with Age Replicate Across Diverse Human Populations. *Genetics* 206, 1659–1674.
- Guo, J.U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G., Song, H., 2011. Hydroxylation of 5-Methylcytosine by TET1 Promotes Active DNA Demethylation in the Adult Brain. *Cell* 145, 423–434.
- Heyn, H., Li, N., Ferreira, H.J., Moran, S., Pisano, D.G., Gomez, A., Diez, J., Sanchez-Mut, J.V., Setien, F., Carmona, F.J., Puca, A.A., Sayols, S., Pujana, M.A., Serra-Musach, J., Iglesias-Platas, I., Formiga, F., Fernandez, A.F., Fraga, M.F., Heath, S.C., Valencia, A., Gut, I.G., Wang, J., Esteller, M., 2012. Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 10522–10527.
- Heyn, H., Moran, S., Hernando-Herraez, I., Sayols, S., Gomez, A., Sandoval, J., Monk, D., Hata, K., Marques-Bonet, T., Wang, L., Esteller, M., 2013. DNA methylation contributes to natural human variation. *Genome Res.* 23, 1363–1372.
- Hong, S.R., Jung, S.E., Lee, E.H., Shin, K.-J., Yang, W.I., Lee, H.Y., 2017. DNA methylation-based age prediction from saliva: High age predictability by combination of 7 CpG markers. *Forensic Sci. Int. Genet.* 29, 118–125.
- Horvath, S., 2013. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 14, R115.
- Horvath, S., Erhart, W., Brosch, M., Ammerpohl, O., von Schonfels, W., Ahrens, M., Heits, N., Bell, J.T., Tsai, P.-C., Spector, T.D., Deloukas, P., Siebert, R., Sipos, B., Becker, T., Rocken, C., Schafmayer, C., Hampe, J., 2014. Obesity accelerates epigenetic aging of human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 15538–15543.
- Horvath, S., Raj, K., 2018. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat. Rev. Genet.* 19, 371–384.
- Hotchkiss, R.D., 1948. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J. Biol. Chem.* 175, 315–332.
- Huang, Y., Pastor, W.A., Shen, Y., Tahiliani, M., Liu, D.R., Rao, A., 2010. The Behaviour of 5-Hydroxymethylcytosine in Bisulfite Sequencing. *PLoS ONE* 5, e8888.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., Zhang, Y., 2011. Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science* 333, 1300–1303.
- Jin, B., Li, Y., Robertson, K.D., 2011. DNA Methylation. *Genes Cancer* 2, 607–617.
- Jung, M., Uhl, B., Kristiansen, G., Dietrich, D., 2015. Bisulfite Conversion of DNA from Tissues, Cell Lines, Buffy Coat, FFPE Tissues, Microdissected Cells, Swabs, Sputum, Aspirates, Lavages, Effusions, Plasma, Serum, and Urine, in: Haggarty, P., Harrison, K. (Eds.), *Population Epigenetics, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 139–159.
- Kaminsky, Z., Petronis, A., 2009. Methylation SNaPshot: A Method for the Quantification of Site-Specific DNA Methylation Levels, in: Tost, J. (Ed.), *DNA Methylation, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 241–255.
- Kaminsky, Z.A., 2005. Single nucleotide extension technology for quantitative site-specific evaluation of metC/C in GC-rich regions. *Nucleic Acids Res.* 33, e95–e95.
- Kareta, M.S., Botello, Z.M., Ennis, J.J., Chou, C., Chédin, F., 2006. Reconstitution and Mechanism of the Stimulation of de Novo Methylation by Human DNMT3L. *J. Biol. Chem.* 281, 25893–25902.

- Kircher, M., Stenzel, U., Kelso, J., 2009. Improved base calling for the Illumina Genome Analyzer using machine learning strategies. *Genome Biol.* 10, R83.
- Kunze, S., 2018. Quantitative Region-Specific DNA Methylation Analysis by the EpiTYPER™ Technology, in: Tost, J. (Ed.), *DNA Methylation Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 515–535.
- Laurent, L., Wong, E., Li, G., Huynh, T., Tsigirgos, A., Ong, C.T., Low, H.M., Kin Sung, K.W., Rigoutsos, I., Loring, J., Wei, C.-L., 2010. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res.* 20, 320–331.
- Lee, H.Y., Jung, S.E., Oh, Y.N., Choi, A., Yang, W.I., Shin, K.-J., 2015. Epigenetic age signatures in the forensically relevant body fluid of semen: a preliminary study. *Forensic Sci. Int. Genet.* 19, 28–34.
- Lee, J.W., Choung, C.M., Jung, J.Y., Lee, H.Y., Lim, S.-K., 2018. A validation study of DNA methylation-based age prediction using semen in forensic casework samples. *Leg. Med.* 31, 74–77.
- Levine, M.E., Lu, A.T., Bennett, D.A., Horvath, S., 2015. Epigenetic age of the pre-frontal cortex is associated with neuritic plaques, amyloid load, and Alzheimer’s disease related cognitive functioning. *Aging* 7, 1198–1211.
- Li, E., Bestor, T.H., Jaenisch, R., 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915–926.
- Li, L., Song, F., Huang, Y., Zhu, H., Hou, Y., 2017. Age-associated DNA methylation determination of semen by pyrosequencing in Chinese Han population. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 6, e99–e100.
- Liao, J., Karnik, R., Gu, H., Ziller, M.J., Clement, K., Tsankov, A.M., Akopian, V., Gifford, C.A., Donaghey, J., Galonska, C., Pop, R., Reyon, D., Tsai, S.Q., Mallard, W., Joung, J.K., Rinn, J.L., Gnirke, A., Meissner, A., 2015. Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 47, 469–478.
- Liu, K., Wang, Y.F., Cantemir, C., Muller, M.T., 2003. Endogenous Assays of DNA Methyltransferases: Evidence for Differential Activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in Mammalian Cells In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2709–2719.
- Luo, R., Bai, C., Yang, L., Zheng, Z., Su, G., Gao, G., Wei, Z., Zuo, Y., Li, G., 2018. DNA methylation subpatterns at distinct regulatory regions in human early embryos. *Open Biol.* 8, 180131.
- Margot, J.B., Aguirre-Arteta, A.M., Di Giacco, B.V., Pradhan, S., Roberts, R.J., Cardoso, M.C., Leonhardt, H., 2000. Structure and function of the mouse DNA methyltransferase gene: Dnmt1 shows a tripartite structure. *J. Mol. Biol.* 297, 293–300.
- Messerschmidt, D.M., Knowles, B.B., Solter, D., 2014. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev.* 28, 812–828.
- Moore, L.D., Le, T., Fan, G., 2013. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology* 38, 23–38.
- Noreen, F., Röösl, M., Gaj, P., Pietrzak, J., Weis, S., Urfer, P., Regula, J., Schär, P., Truninger, K., 2014. Modulation of Age- and Cancer-Associated DNA Methylation Change in the Healthy Colon by Aspirin and Lifestyle. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 106.
- Okae, H., Chiba, H., Hiura, H., Hamada, H., Sato, A., Utsunomiya, T., Kikuchi, H., Yoshida, H., Tanaka, A., Suyama, M., Arima, T., 2014. Genome-Wide Analysis of DNA Methylation Dynamics during Early Human Development. *PLoS Genet.* 10, e1004868.

- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E., 1999. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell* 99, 247–257.
- Park, J.-L., Kim, J.H., Seo, E., Bae, D.H., Kim, S.Y., Lee, H.C., Woo, K.M., Kim, Y.S., 2016. Identification and evaluation of age-correlated DNA methylation markers for forensic use. *Forensic Sci. Int. Genet.* 23, 64–70.
- Rothberg, J.M., Hinz, W., Rearick, T.M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J.H., Johnson, K., Milgrew, M.J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J.F., Marran, D., Myers, J.W., Davidson, J.F., Branting, A., Nobile, J.R., Puc, B.P., Light, D., Clark, T.A., Huber, M., Branciforte, J.T., Stoner, I.B., Cawley, S.E., Lyons, M., Fu, Y., Homer, N., Sedova, M., Miao, X., Reed, B., Sabina, J., Feierstein, E., Schorn, M., Alanjary, M., Dimalanta, E., Dressman, D., Kasinskas, R., Sokolsky, T., Fidanza, J.A., Namsaraev, E., McKernan, K.J., Williams, A., Roth, G.T., Bustillo, J., 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475, 348–352.
- Shen, J.-C., Rideout, W.M., Jones, P.A., 1994. The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* 22, 972–976.
- Shiraishi, M., 2004. High-Speed Conversion of Cytosine to Uracil in Bisulfite Genomic Sequencing Analysis of DNA Methylation. *DNA Res.* 11, 409–415.
- Smith, Z.D., Chan, M.M., Humm, K.C., Karnik, R., Mekhoubad, S., Regev, A., Eggan, K., Meissner, A., 2014. DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. *Nature* 511, 611–615.
- Spólnicka, M., Pośpiech, E., Adamczyk, J.G., Freire-Aradas, A., Peplowska, B., Zbieć-Piekarska, R., Makowska, Ż., Pięta, A., Lareu, M.V., Phillips, C., Płoski, R., Żekanowski, C., Branicki, W., 2018. Modified aging of elite athletes revealed by analysis of epigenetic age markers. *Aging* 10, 241–252.
- Suchiman, H.E.D., Sliker, R.C., Kremer, D., Slagboom, P.E., Heijmans, B.T., Tobi, E.W., 2015. Design, measurement and processing of region-specific DNA methylation assays: the mass spectrometry-based method EpiTYPER. *Front. Genet.* 6.
- Susan, J.Ci., Harrison, J., Paul, C.L., Frommer, M., 1994. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* 22, 2990–2997.
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., Rao, A., 2009. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* 324, 930–935.
- Takeshima, H., Suetake, I., Shimahara, H., Ura, K., Tate, S., Tajima, S., 2006. Distinct DNA Methylation Activity of Dnmt3a and Dnmt3b towards Naked and Nucleosomal DNA. *J. Biochem. (Tokyo)* 139, 503–515.
- Tanaka, K., Okamoto, A., 2007. Degradation of DNA by bisulfite treatment. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 1912–1915.
- Tiedemann, R.L., Putiri, E.L., Lee, J.-H., Hlady, R.A., Kashiwagi, K., Ordog, T., Zhang, Z., Liu, C., Choi, J.-H., Robertson, K.D., 2014. Acute depletion redefines the division of labor among DNA methyltransferases in methylating the human genome. *Cell Rep.* 9, 1554–1566.
- Tost, J., Gut, I.G., 2007. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat. Protoc.* 2, 2265–2275.

- Valinluck, V., Sowers, L.C., 2007. Endogenous Cytosine Damage Products Alter the Site Selectivity of Human DNA Maintenance Methyltransferase DNMT1. *Cancer Res.* 67, 946–950.
- Varley, K.E., Gertz, J., Bowling, K.M., Parker, S.L., Reddy, T.E., Pauli-Behn, F., Cross, M.K., Williams, B.A., Stamatoyannopoulos, J.A., Crawford, G.E., Absher, D.M., Wold, B.J., Myers, R.M., 2013. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res.* 23, 555–567.
- Weidner, C.I., Lin, Q., Koch, C.M., Eisele, L., Beier, F., Ziegler, P., Bauerschlag, D.O., Jöckel, K.-H., Erbel, R., Mühleisen, T.W., Zenke, M., Brümmendorf, T.H., Wagner, W., 2014. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol.* 15, R24.
- Woodcock, D.M., Lawler, C.B., Linsenmeyer, M.E., Doherty, J.P., Warren, W.D., 1997. Asymmetric Methylation in the Hypermethylated CpG Promoter Region of the Human L1 Retrotransposon. *J. Biol. Chem.* 272, 7810–7816.
- Xu, G.-L., Bestor, T.H., Bourc'his, D., Hsieh, C.L., Tommerup, N., Bugge, M., Hulten, M., Qu, X., Russo, J.J., Viegas-Péquignot, E., 1999. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 402, 187–191.
- Zampieri, M., Ciccarone, F., Calabrese, R., Franceschi, C., Bürkle, A., Caiafa, P., 2015. Reconfiguration of DNA methylation in aging. *Mech. Ageing Dev., Biomarkers of Human Ageing* 151, 60–70.
- Zbieć-Piekarska, R., Spólnicka, M., Kupiec, T., Makowska, Ż., Spas, A., Parys-Proszek, A., Kucharczyk, K., Płoski, R., Branicki, W., 2015a. Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. *Forensic Sci. Int. Genet.* 14, 161–167.
- Zbieć-Piekarska, R., Spólnicka, M., Kupiec, T., Parys-Proszek, A., Makowska, Ż., Pałeczka, A., Kucharczyk, K., Płoski, R., Branicki, W., 2015b. Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Sci. Int. Genet.* 17, 173–179.
- Ziller, M.J., Gu, H., Müller, F., Donaghey, J., Tsai, L.T.-Y., Kohlbacher, O., De Jager, P.L., Rosen, E.D., Bennett, D.A., Bernstein, B.E., Gnirke, A., Meissner, A., 2013. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* 500, 477–481.