

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Linda Stokičová**

Predikce biologického věku pomocí analýzy DNA

Biological age prediction using DNA analysis

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Daniel Vaněk, Ph.D.

Praha, 2022

## **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,

Podpis

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Danielu Vaňkovi, Ph.D. za jeho rady, rychlou komunikaci a především čas, který věnoval opravám práce a společným konzultacím.

## **Abstrakt**

Na základě analýzy DNA lze predikovat barvu očí, vlasů a biogeografický původ jedince. Toho se využívá ve forenzní genetice, kdy neznámý pachatel zanechá biologický materiál na místě trestného činu. Předmětem výzkumů je predikce biologického věku pachatele. V současnosti ale neexistuje žádný standardizovaný model, podle kterého lze spolehlivě biologický věk jedince predikovat. Jako nejlepší metoda se jeví predikce biologického věku na základě methylace DNA, což je stabilní epigenetická modifikace. Bylo zkoumáno mnoho markerů v různých tkáních. Methylace těchto markerů koreluje s biologickým věkem, pozitivně či negativně. Methylace je tkáňově specifická, a tak nelze jeden model aplikovat na všechny tkáně. Model pro predikci biologického věku se uplatní zejména při vyšetřování a objasňování trestné činnosti, kdy neznáme identitu osoby, jež zanechala biologický materiál na místě činu či těle oběti.

**Klíčová slova:** methylace, chronologický věk, biologický věk, analýza DNA, forenzní genetika

## **Abstract**

Eye colour, hair colour and biogeographical origin can be predicted based on DNA analysis. This is used in forensic genetics when an unknown perpetrator leaves a biological material on a crime scene. Prediction of biological age is the subject of further research. Nowadays, there is no standardised model, which can be used for accurate prediction. The best option for biological age prediction is DNA methylation – stable epigenetic modification. Many markers have been evaluated. Methylation of these markers correlates with biological age positively or negatively. Methylation has tissue specificity, so one model cannot be applied on all types of tissues. Model for biological age prediction can be applied during investigating of a criminal activity, when the identity of a person committing a crime is unknown.

**Key words:** methylation, chronological age, biological age, DNA analysis, forensic genetics

# Obsah

1.	Úvod.....	1
1.1.	Chronologický vs. biologický věk.....	1
1.2.	Tradiční čínská medicína.....	1
2.	Současné poznatky ve vědě.....	3
2.1.	Sekvenace lidského genomu.....	3
2.2.	ENCODE.....	6
2.3.	Stárnutí .....	6
2.3.1.	Zkracování telomer.....	6
2.3.3.	ROS, mitochondriální mutace .....	8
2.4.	Antioxidanty.....	9
2.5.	Methylace .....	9
2.6.	Hydroxymethylace .....	11
2.7.	Proteiny s potenciálem ovlivnit stárnutí .....	12
2.7.1.	Sirtuiny .....	12
2.7.2.	mTOR.....	13
2.7.3.	FOXO .....	13
2.7.4.	AMPK .....	13
3.	Životní styl .....	14
4.	Komerční využití.....	15
5.	Forenzní aplikace .....	15
5.1.	Statistické termíny .....	16
5.1.1.	Korelační koeficient .....	16
5.1.2.	Standardní odchylka .....	16
5.1.3.	Rozptyl .....	16
5.1.4.	Standardní chyba .....	16
5.1.5.	Průměrná absolutní odchylka .....	16
5.1.6.	Střední absolutní odchylka .....	16
5.2.	Metody predikce biologického věku .....	16
5.2.1.	Racemizace kyseliny asparagové .....	16
5.2.2.	Konečné produkty pokročilé glykace .....	17
5.2.3.	Mitochondriální delece.....	18
5.2.4.	Délka telomer .....	18
5.2.5.	Methylace DNA.....	22
6.	Závěr .....	29
7.	Seznam použité literatury.....	30

## Seznam použitých zkratek

AGEs	konečné produkty pokročilé glykace
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	AMP-aktivovaná protein kináza
APM	model pro predikci věku
BAC	bakteriální uměle vytvořený chromozom
BMI	body mass index
bp	pár bází
C1orf132	MIR29B2 and MIR29C host gene
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytosintrifosfát
ddATP	dideoxyadenosintrifosfát
ddCTP	dideoxycytosintrifosfát
ddGTP	dideoxyguanosintrifosfát
ddNTPs	dideoxyribonukleotidtrifosfáty
ddTTP	dideoxythymidintrifosfát
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Dnmts	methyltransferázy
dNTPs	deoxyribonukleotidtrifosfáty
dTTP	deoxythymidintrifosfát
<i>ELN</i>	elastin
<i>ELOVL2</i>	ELOVL fatty acid elongase 2
ENCODE	ENCyclopedia of DNA Elements
<i>FHL2</i>	four and a half LIM domains 2
HGP	Human Genome Project
kb	kilopáry bází
MAD	průměrná absolutní odchylka
Mbp	mega pár bází

mtDNA	mitochondriální DNA
mTOR	mammalian target of rapamycin
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NAD <sup>+</sup>	oxidovaný nikotinamidadenindinukleotid
NaHSO <sub>3</sub>	hydrogensířičitan sodný
<i>NOPI4</i>	NOPI4 nucleolar protein
<i>NPTX2</i>	neuronal pentraxin 2
PCR	polymerase chain reaction
<i>PDE4C</i>	phosphodiesterase 4C
<i>PENK</i>	proenkephalin
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
rDNA	ribosomální DNA
ROS	reaktivní formy kyslíku
SE	standardní chyba
SIRT	sirtuin
TCM	tradiční čínská medicína
<i>Tom1L1</i>	target of myb1 like 1 membrane trafficking protein
TRF	terminální restriční fragment
T2T	the Telomere-to-Telomere Consortium
<i>USP11</i>	ubiquitin specific peptidase 11
<i>ZIC5</i>	Zic family member 5
<i>ZNF423</i>	zinc finger protein 423
5hmC	5-hydroxymethylcytosin
5mC	5-methylcytosin

# 1. Úvod

S motivy dlouhověkosti a nesmrtelnosti se setkáváme v různých pohádkách, filmech či u historických postav. Spousta lidí si přála přinejmenším zůstat stále mladá především ve formě zachování si mladě vyhlížejícího vzhledu.

Jedním takovým příkladem je hraběnka Alžběta Bátoriová (Báthory Erzesébet) přezdívána Čachtická paní. Žila v letech 1560 – 1614 a byla uherskou hraběnkou. Rod Báthoryů provázely četné výstřední a extrémní povahové vlastnosti, mezi nimiž se uvádí sklony k samolibosti, pýše, tyranství a sexuální zvrácenosti. Na druhou stranu vynikali svou statečností a milovali dobrodružství. Hraběnka Bátoriová byla na svou dobu vzdělaná, dokázala být střídavě velice laskavá a následně nemilosrdně krutá. Jejím snem bylo zůstat co nejdéle mladá a krásná. Podle legend se toho snažila dosáhnout koupelemi v krvi panen. Krutě zabíjela své služky a využívala na ony rituály jejich krev. Vraždy se vždy snažila utajit. Jednoho dne ale pravda stejně musela vyjít najevo, a tak byli odsouzeni nejprve hraběncini pomocníci. Sama hraběnka se ocitla v samovazbě ve věznici na Čachtickém hradu, kde o čtyři roky poté zemřela. Někteří historici ale označují celý proces za vykonstruovaný. K těmto obviněním mělo dojít proto, aby se uherští šlechtici mohli ujmout hraběnciných pozemků (Bednařík, 2006; Lengyelová a Várkonyi, 2009).

Dále se motiv zachování si mladého vzhledu objevuje například v pohádce Císařův pekař a pekařův císař, kde si král Rudolf II. přál omládnout. Najímal proto různé alchymisty, kteří pro něj, mimo ostatní vynálezy, vyráběli také elixír mládí.

## 1.1. Chronologický vs. biologický věk

Chronologický (kalendářní) věk je přesně vymezen datem narození. S biologickým věkem se může shodovat, ale také se od něj lišit. Biologický věk udává míru vývoje jedince a je ovlivněn životním stylem a prostředím (Demongeot, 2009).

## 1.2. Tradiční čínská medicína

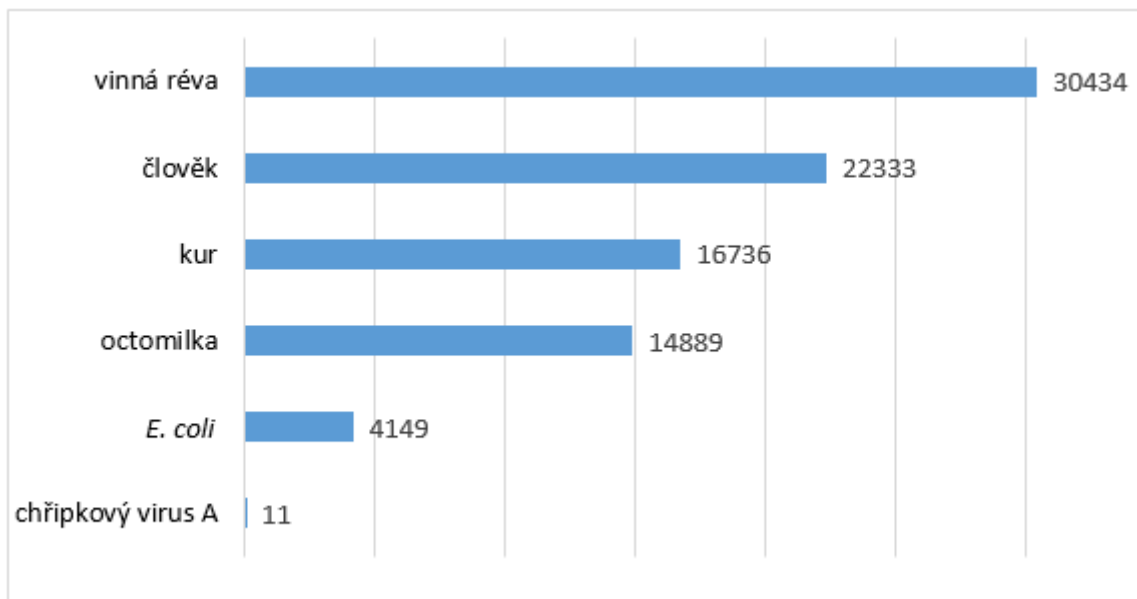
Tradiční čínská medicína (TCM), jejíž tradice sahá více jak 2 000 let do minulosti, je soubor metod prevence, vyšetření a léčby založených na tradičním čínském léčení. Mezi hlavní léčebné metody patří fytotherapie (terapie bylinnými přípravky), akupunktura, akupresura, masáže, cvičení a dietetika (každodenní strava sestavená na základě konstituce člověka a ročního období). TCM má vlastní diagnostický systém, kdy vnímá tělo jako celek, uvědomuje si souvislosti mezi jednotlivými orgány a nemocemi a díky tomu dokáže odhalit skryté příčiny nemocí. Vnímá člověka v jednotě s jeho prostředím, přírodou, ročním obdobím a životní etapou. TCM stojí na dvou základních principech: jin a jang a 5 elementech. Jin a jang jsou dvě stránky každého jevu v přírodě. Jsou to protiklady, které nemohou existovat jeden bez druhého a jejich existenci je nutno vyvažovat. Mezi 5 elementů patří dřevo, oheň, země, kov a voda. Tyto prvky jsou nezbytné pro fungování přírody i lidskou existenci. TCM klade

velký důraz na prevenci onemocnění. Snaží se tedy nemocem předcházet (TCM World, 2022). Yang sheng fa je koncept udržení si fyzického i psychického zdraví až do stáří. Naše zdraví máme ve vlastních rukou, a proto záleží na tom, co pro něj děláme. Jídlo, které jíme, nás přímo ovlivňuje a mělo by být kvalitní. Bez řádné výživy budeme pociťovat únavu a budeme mít sníženou imunitu, což povede k nemoci. Jídlo bychom neměli jíst ani příliš horké, ani příliš studené. Jídlo o extrémních teplotách není vhodné pro žaludek, který vyžaduje jídlo tělesné teploty, aby ho mohl co nejlépe trávit. V TCM spadá každá potravina do kategorie: horké, teplé, neutrální, chladné a studené. Je vhodné konzumovat potraviny, jejichž individuální teplota (podle kategorie) se jejich vzájemnou kombinací vyrovná. Tím se uvede do rovnováhy také jin a jang v našem těle. Maso je podle TCM stejně důležité jako zelenina. Obsahuje důležité pro člověka nezbytné nutrienty. Na druhou stranu příliš velké dávky masa mohou způsobit obtíže s pozorností a některé nemoci. Abychom se tomuto vyvarovali, je důležité konzumovat maso společně se zeleninou, která obsahuje také mnoho nutrientů (Aspell, 2012). Navíc napomáhá trávení a čistí střeva a žaludek (Zhanwen a Lieguang, 2007). I přestože zelenina obsahuje potřebné nutrienty, neposkytuje tělu vše, co potřebuje, proto je kombinace masa a zeleniny nezbytná. Není doporučeno konzumovat přílišné množství potravy stejně tak příliš nízké, kdy hrozí nedostatek nutrientů. Oba případy povedou ke stárnutí organismu. Největší porci jídla bychom měli jíst ráno a menší večer. Pro zachování zdraví je důležitá také kultivace mysli, kterou lze zprostředkovat pomocí meditace, mindfulness a dalšího. Je to jeden ze způsobů, jak předcházet nemocem. Naše mysl by měla být klidná, ale zároveň angažovaná, dále emočně stabilní a osvobozená od nadměrné touhy. To nám umožní jednat jasně a rozumně. Aby se naše mysl mohla soustředit, je nutné v jeden okamžik věnovat pozornost pouze jedné věci. Koníčky a ostatní aktivity jsou skvělým způsobem, jak se odreagovat od každodenního stresu (Aspell, 2012). Jedním z hlavních prostředků léčby a prevence je v TCM fytoterapie a užívání vitálních hub. Při fytoterapii se využívají propracované recepty sestavené z bylin. Dříve bylo rozšířené také užívání produktů z minerálů a živočišných produktů. Od jejich užívání se dnes ale spíše upouští. TCM zná spoustu hub s pozitivními účinky na lidské zdraví. Jedním takovým příkladem je *Ganoderma lucidum* (lesklokorka lesklá, reishi), která je využívána k dosažení dlouhého a zdravého života. Z této houby, nazývané houba nesmrtelnosti, se vyráběl elixír mládí (Liu a Bau, 1980). V dnešní době je využívána pro zklidnění mysli, na podporu imunity díky obsahu  $\beta$ -glukanů a jako antioxidant (Nahata, 2013).

## 2. Současné poznatky ve vědě

### 2.1. Sekvence lidského genomu

Human Genome Project (HGP) byl mezinárodní výzkumný projekt na zmapování sekvence veškeré lidské DNA. Velikost lidského genomu činí přibližně  $3,1 \times 10^9$  bp (Li, 2011), přičemž obsahuje asi 20 000 – 25 000 genů, avšak jejich přesný počet není dosud znám. Odhaduje se na 22 333 genů, viz obrázek 1 (Pertea a Salzberg, 2010).



Obrázek 1: Srovnání počtu genů u různých organismů. Nejblíže odhadovaný počet genů člověka je 22333. Upraveno dle Pertea a Salzberg, 2010.

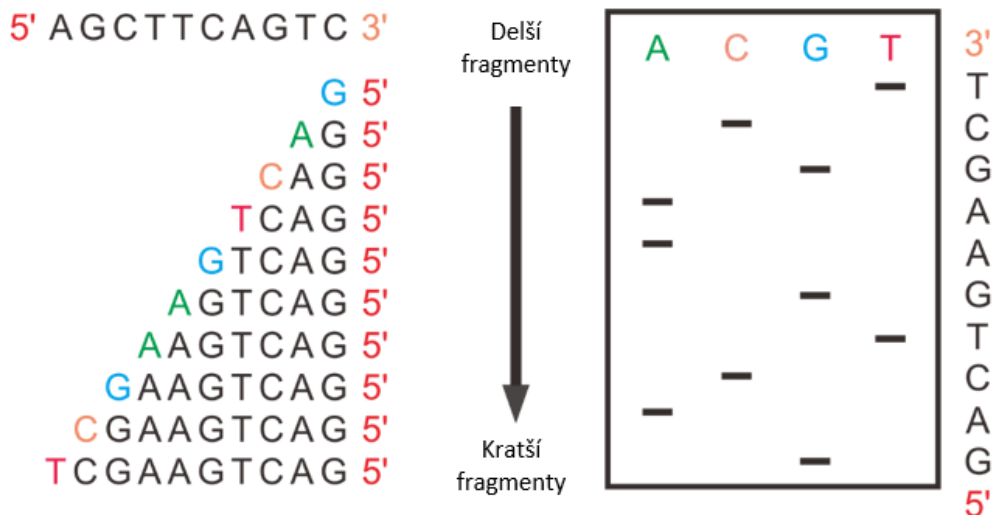
Projekt byl spuštěn v říjnu 1990 a probíhal do dubna 2003, kdy byl úspěšně dokončen. Za kompletní dokončení projektu by bylo nicméně správné považovat až letošní rok, kdy bylo konsorciem T2T (the Telomere-to-Telomere Consortium) dokončeno sekvenování zbývajících 8% genomu. Publikace také udává nové číslo o počtu genů, tedy 19 969 genů (Nurk *et al.*, 2022). Americký Národní institut zdraví a Ministerstvo energetiky Spojených států amerických zprostředkovali financování projektu (Watson, 1990). Přispělo k němu celkem 18 zemí. Většina sekvenování probíhala na univerzitách a výzkumných centrech v USA, dále ve Velké Británii, Japonsku, Francii, Německu a Číně. Nejprve byl projekt veden Jamesem D. Watsonem (1990 – 1992), kterého později nahradil Francis S. Collins (1993 – 2003). Cílem nebylo osekvenování pouze lidského genomu, ale také několika modelových organismů (*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* a *Drosophila melanogaster*), což se také zdařilo a díky HGP máme jejich kompletní sekvenci genomu. Publikovány byly také předfinální verze genomů některých organismů, mezi nimi *Mus musculus* (Collins *et al.*, 2003).

Protože genom každého jedince je unikátní, muselo být osekvenováno několik jedinců (dobrovolníků), z čehož byla sestavena výsledná sekvence pro každý chromozom. Výsledkem tedy není genom jednoho konkrétního jedince. Vzorke krve pro izolaci DNA byly anonymizovány, takže ani dobrovolníci sami

nevědí, zda jejich biologický materiál byl nakonec použit, či nikoliv. Osekvenováno bylo všech 23 lidských chromozomů, které se v buňkách nacházejí v páru. (Lander *et al.*, 2001) Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 50 – 300 Mbp.

Hlavní použitou metodou bylo tzv. BAC klonování odvozené od bakteriálního umělého chromozomu (Collins *et al.*, 2003). DNA byla nejprve fragmentována na 150 – 200 kbp dlouhé úseky. Ty byly následně naklonovány do bakterie, kde se replikovaly. Vnesení DNA do bakterie umožňuje snadnou manipulaci a zajišťuje její stabilitu (Shizuya *et al.*, 1992). Bakteriální klony byly rozštěpeny na menší fragmenty o velikosti asi 2 000 bp, které se využily pro samotné sekvenování. U každého klonu byla určena přesná lokace v genomu, a tak bylo možno zjistit, v jakém místě genomu se nachází jaká sekvence. Sekvence lidského genomu je v databázích přístupná veřejnosti (National Library of Medicine).

Jako sekvenační metoda bylo využito Sangerovo dideoxy sekvenování (Collins *et al.*, 2003). Využívá principu replikace DNA. Ke každému jednořetězcovému fragmentu nasedá primer, který je k dané sekvenci komplementární. Dále probíhá syntéza DNA, kdy DNA polymeráza zařazuje deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTPs) – dATP, dCTP, dGTP a dTTP. Směs obsahuje také dideoxyribonukleotidtrifosfáty (ddNTPs) – ddATP, ddCTP, ddGTP a ddTTP ve stonásobně menším množství. Vzorek DNA je rozdělen do čtyř zkumavek, přičemž v každé je jeden ze čtyř ddNTPs, který je radioaktivně značený, a všechny dNTPs. DNA polymeráza zařazuje dNTPs, ale občas zařadí ddNTP, což způsobí terminaci syntézy. Je to způsobeno tím, že ddNTP nemá na 3' OH skupinu, tudíž se nemůže vytvořit další fosfodiesterová vazba, na kterou by byl navázán následující dNTP. Díky tomuto získáme fragmenty o různé délce, čehož se využije při elektroforéze, kdy se jednotlivé nově vzniklé fragmenty seřadí podle délky. Na základě radioaktivních značek pak můžeme zjistit, jaká báze se nachází na jakém konkrétním místě a tedy zjistit přesnou sekvenci DNA (Sanger *et al.*, 1997). Později se metoda začala využívat v různých obměnách, včetně využití fluorescence pro optickou detekci, kdy každý dideoxynukleotid má svou fluorescenční značku, viz obrázek 2.



Obrázek 2: Schéma Sangerova sekvenování. Vlevo nahoře templát DNA, podle kterého vznikají různě dlouhé fragmenty umístěné pod ním. Fragmenty se na základě různé délky rozdělí na elektroforéze. Směrem odshora od nejdelšího po nejkratší, které jsou dole. Z výsledku elektroforézy zjistíme sekvenci, která je komplementární k templátu. 3dgenome, 2019.

Sangerově metodě sekvenování předcházelo Maxam-Gilbertovo sekvenování (Maxam a Gilbert, 1977). Obě výše zmíněné metody sekvenování patří do 1. generace sekvenování. Následovala 2. generace (next generation sequencing) (Shendure a Ji, 2008) a 3. generace (third generation sequencing) (Rusk, 2009), které jsou rychlejší, levnější a efektivnější.

Znalost sekvence lidského genomu umožňuje rozvoj medicíny, lepší porozumění tomu, jak spolu jednotlivé geny souvisí a také rozvoj forenzní genetiky. Pomáhá nám pochopit dědičné faktory srdečních onemocnění, rakoviny, diabetu, schizofrenie a dalších (Collins *et al.*, 2003). Na základě sekvence genomu konkrétního jedince jsme schopni předcházet chorobám, které by jedince postihly a již preventivně jim předcházet, takže by se nemuseli rozvinout do takové míry. Dále se otevírá možnost vytvářet léky, které mají větší efektivitu, zejména s ohledem na konkrétního jedince. V pokročilé forenzní genetice lze aplikovat poznatky z biomedicínských oborů a například predikovat biologický věk donora biologického materiálu. Před spuštěním HGP probíhal výzkum více v jednotlivých laboratořích. To se následně do jisté míry změnilo. V současnosti je více kooperativních výzkumů, často mezinárodních, kdy několik laboratoří spolupracuje na jednom projektu. Díky HGP došlo také k automatizaci a zvýšení efektivity běžně prováděných výzkumných metod (Collins *et al.*, 2003).

Projekt lze tedy považovat za velmi úspěšný. Mimo jeho velký význam je tu také fakt, že byl dokončen dříve, než se předpokládalo. Původně byl plánován na 15 let a vystačil s méně financemi, než se předpokládalo. Financován byl přibližně 200 miliony dolary (Collins *et al.*, 2003).

Paralelně k veřejnému HGP běžel druhý projekt na osekvenování lidského genomu a to soukromý projekt společnosti Celera Genomics po vedením J. Craiga Ventera. Nebýt tohoto projektu, vše by nebylo dokončeno tak rychle, jak se podařilo. Díky J. C. Venterovi se zvýšilo úsilí při sekvenování, byl průkopníkem automatických genetických sekvenátorů a zasloužil se v roce 1995 o první osekvenování genomu celého organismu, kterým byl *Haemophilus influenzae* (Nowak 1995). Oběma skupinám se

zdařilo zmapovat lidský genom nezávisle na sobě. I přes některé neshody, jako například komu bude sekvence genomu přístupná, se domluvili na publikaci předfinálních verzí genomu ve stejný den (Shampo a Kyle, 2011). Výsledky byly publikovány v roce 2001 v časopisech Nature (Lander *et al.*, 2001) a Science (Venter *et al.*, 2001).

## 2.2. ENCODE

Protože HGP vygeneroval velké množství dat, se kterými je ještě potřeba pracovat, jsou tu další projekty, které nám pomáhají objasnit další otázky. Jedním z nich je ENCODE (ENCyclopedia of DNA Elements) - výzkumný projekt navazující na HGP. Jeho cílem je zmapovat funkční elementy lidského genomu. Odstartoval v září roku 2003 a pokračuje dodnes. Od jeho počátku se toho o lidském genomu dovídáme stále více a více. Díky němu zjišťujeme, jak jsou geny regulovány a jaké mohou být isoformy transkriptů.

## 2.3. Stárnutí

Stárnutí je komplexní biologický proces, který se týká všech tkání našeho těla. Dochází k celkovému poklesu vitality a odolnosti organismu, souvisí se změnami DNA i proteinů. Stárneme již od okamžiku početí. Stárnutí ovlivňuje kombinace genetických a environmentálních faktorů, společně se stravou a životním stylem (Srivastava, 2019). Je zde několik teorií podle jednotlivých příčin, které nám proces stárnutí pomáhají objasnit. Jednou takovou velice známou a lehce překvapivou je teorie stárnutí podle Davida Sinclaira, který zastává názor, že stárnutí je nemoc, tudíž se dá léčit (Sinclair a LaPlante, 2019).

Mezi hlavní příčiny stárnutí lze zařadit zkracování telomer, negativní působení reaktivních forem kyslíku (ROS) na DNA a ostatní biomolekuly či hromadění mutací a jiných defektů DNA vzniklých nejčastěji při replikaci. Jednotlivé příčiny stárnutí budou nyní rozebrány podrobněji.

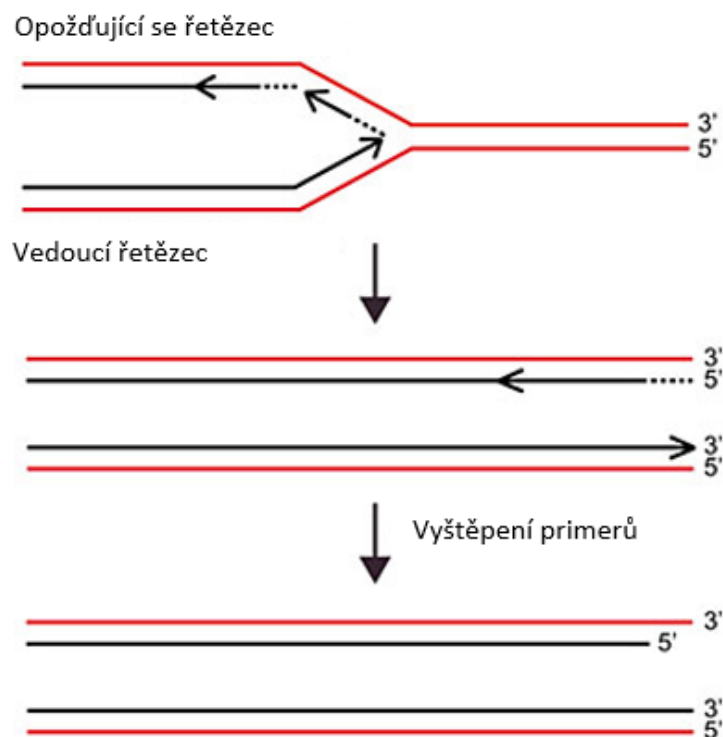
### 2.3.1. Zkracování telomer

Telomery jsou repetitivní nukleoproteinové komplexy na konci chromozomů většiny eukaryotických organismů. Nejčastěji je tvoří opakující se sekvence TTAGGG, tak je tomu u obratlovců včetně člověka (Moyzis *et al.*, 1988). Na 3' konci mají přesahující vlákno, které vytváří G-kvadruplex (Kar *et al.*, 2018). Samotný 3' konec tvoří přesah, který je zanořen do předcházejícího double-strandu DNA, čímž vzniká tzv. T-smyčka, viz obrázek 3 (Broccoli, 2004). S telomerami je asociována řada proteinů, které tvoří komplex zvaný shelterin. Jejich hlavní funkcí je ochrana konců chromozomů, zároveň pomáhají udržet T-smyčku (Bilaud *et al.*, 1997; Van Steensel *et al.*, 1998).



Obrázek 3: Struktura telomery s 3' přesahem zanořeným do double-strandu DNA tvoří T-smyčku. De Lange, 2004.

Telomery jsou nekódující sekvence, které zabraňují ztrátě kódující části chromozomů. Zároveň chrání chromozom před nukleázami a zamezují rekombinaci s jinými geny (Das *et al.*, 2009). Při každé replikaci dochází k jejich zkracování, což je způsobeno nemožností polymerázy plně syntetizovat opoždující se vlákno DNA (Olovnikov, 1973). Opoždující se vlákno je syntetizováno Okazakiho fragmenty a po vyštěpení primeru, zůstává část vlákna nedosyntetizovaná, viz obrázek 4. Průměrná délka telomer člověka je 5 – 15 kb (Samassekou *et al.*, 2010). Během každé replikace se zkrátí o 50 – 200 bp (Allsopp *et al.*, 1992). Mohou se zkrátit přibližně čtyřicetkrát až šedesátkrát, než dosáhnou kritické délky = tzv. Hayflickův limit (Hayflick, 1965). Poté se buňka stává senescentní, kdy již není schopná se dále dělit. Prodloužení telomer může zprostředkovat enzym telomeráza (Counter *et al.*, 1992). Jedná se o reverzní transkriptázu, která je schopna prodloužit 3' přesahující vlákno opoždujícího se řetězce, čímž umožní DNA polymeráze dosyntetizovat dceřiné vlákno podle matrice. Telomeráza je aktivní pouze v buňkách, které se často dělí. Jsou to buňky embryonálního vývoje, buňky kmenové, buňky zárodečné linie a aktivované buňky imunitního systému (Forsyth *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 1994). V somatických buňkách je většinou inaktivována, aby nedošlo k neomezenému dělení a rakovinnému bujení (Allsopp *et al.*, 1992). Zkracování telomer je biomarkerem buněčného stárnutí. Souvisí také s níže zmíněným oxidativním stresem a onemocněními pojíci se s vysokým věkem (Starr *et al.*, 2008).



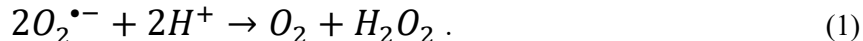
Obrázek 4: Syntéza vedoucího a opoždujícího se řetězce DNA, následné vyštěpení primerů a vznik nekompletního 5' konce na nově vzniklém vlákně podle opoždujícího se řetězce. Upraveno dle Longhese, 2012.

### 2.3.2. Hromadění somatických mutací

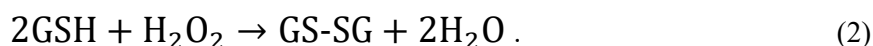
Na organismy působí exogenní vlivy jako je UV záření, ionizující záření, těžké kovy, chemické látky a endogenní ROS. Ty během života jedince způsobují různé chyby např. v replikaci, a tak se hromadí defekty na DNA. Buňka má ale opravné mechanismy, a tak jim do jisté míry může zabránit. Oprava spočívá například v proofreadingové aktivitě polymerázy. Dále má buňka řadu enzymů, které opravy umožňují. Pokud jsou chyby již příliš rozsáhlé a není možné je opravit, vstoupí buňka buď do senescence, provede apoptózu, nebo u ní dojde k nekontrolovatelnému dělení (Iyama a Wilson, 2013). To je způsob, jak množství chyb v buňce snížit, protože chyby se rozdělí do dvou dceřiných. Toto je jeden ze způsobů vzniku rakoviny (Hrycay a Bandiera, 2015).

### 2.3.3. ROS, mitochondriální mutace

Mezi reaktivní formy kyslíku (ROS z anglického reactive oxygen species) patří superoxid ( $\bullet O_2^-$ ), hydroxylový radikál ( $HO\bullet$ ), oba v podobě volných radikálů obsahujících nepárový elektron, a dále peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ). K jejich vzniku dochází hlavně v respiračním řetězci a pro organismus jsou toxické (Harman, 1956). Superoxid je mimo jiné produkován také při oxidačním vzplanutí některých fagocytů. Buňka se s tímto oxidativním stresem musí vypořádat, a tudíž je odstraňuje pomocí enzymů antioxidační ochrany. Superoxid dismutáza katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku, který je méně toxický



$H_2O_2$  může být následně pomocí glutathion peroxidázy redukován na vodu



Reakci, kdy z  $H_2O_2$  také vzniká voda a kyslík může zprostředkovávat kataláza



Pokud dochází ke zvýšené produkci ROS, vzniká nerovnováha a oxidativní stres. Ten má za následek poškození membrán a makromolekul (lipidů, sacharidů, proteinů a nukleových kyselin) (Hrycay a Bandiera, 2015). Oxidativní stres souvisí také se zkracováním telomer a stárnutím (Starr *et al.*, 2008) a může vést k neurodegenerativním onemocněním (Beetsch *et al.*, 1998).

Mitochondriální DNA (mtDNA) je ke vzniku mutací náchylnější než jaderná DNA. Což je dáno tím, že postrádá některé z opravných mechanismů a histony. Musí se často dělit, čímž vzrůstá pravděpodobnost vzniku mutací. Dále v mitochondriích probíhá buněčná respirace, při které se uvolňují ROS, jež mtDNA poškozují (Jacobs, 2003). Způsobují jedno- nebo dvouřetězcové zlomy, modifikace bází a propojení příčnými vazbami (Hrycay a Bandiera, 2015).

Výše byly popsány hlavní příčiny stárnutí. Je jich ale ještě více. Například genomová nestabilita, změny epigenomu, narušení údržby stability a funkčnosti proteinů (proteostáza), deregulované detekce živin vlivem metabolických změn, nahromadění senescentních buněk vyvolávajících zánět ve zdravých buňkách, vyčerpání kmenových buněk a narušení mezibuněčné komunikace. Příčin může být ještě více, jen nebyly doposud objeveny. Díky tomu, že známe jednotlivé příčiny, je můžeme zkoumat a pokud tyto procesy napravíme, zpomalíme tím stárnutí a prodloužíme průměrnou délku života. S prodloužením stáří ve zdraví se také sníží náklady na léčbu. (Sinclair a LaPlante, 2019).

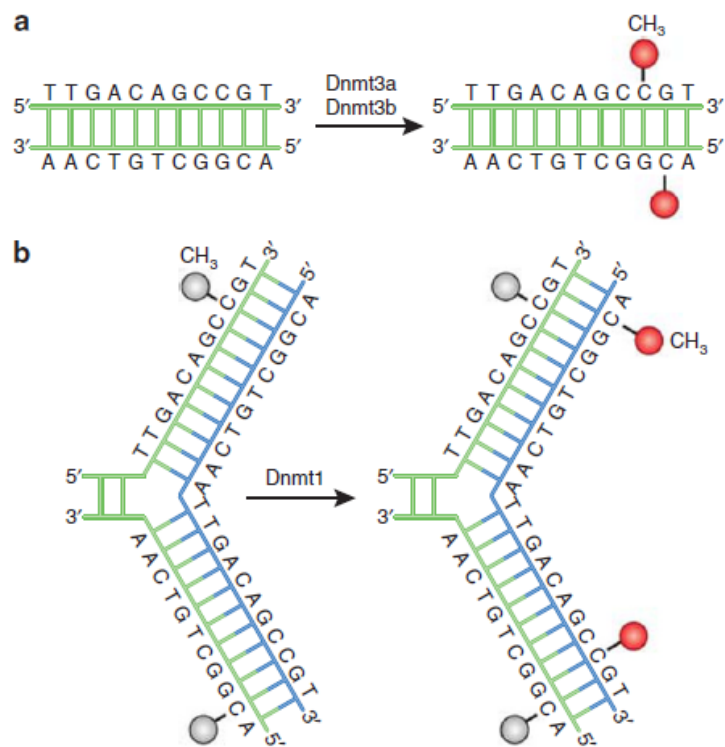
Lidé, kterým je 100 a více let, stárnou pomaleji oproti mladším jedincům. Bylo zjištěno, že v jejich séru jsou proteiny, jejichž exprese je jiná než u mladších osob. Exprese některých proteinů je snižena, některých zase zvýšená. Ukázalo se, že aktivita některých biologických drah, jako je mTOR signalizace a angiogeneze, je u 100letých lidí zvýšená. Zároveň mají sníženou hladinu ghrelinu, což je hormon, který vyvolává pocit hladu vedoucí ke zvýšení příjmu potravy. Toto je konzistentní se zvýšenou hladinou GDF15, což společně predikuje anorektický fenotyp (Sebastiani *et al.*, 2021).

#### **2.4. Antioxidanty**

Mezi antioxidanty řadíme antioxidační enzymy a antioxidanty neenzymatické povahy. Antioxidační enzymy jsou výše zmíněné enzymy (superoxid dismutáza, glutathion peroxidáza a kataláza). Hlavní úlohou antioxidantů je přeměna ROS na méně reaktivní molekuly, čímž snižují poškození biomolekul. Antioxidanty neenzymatické povahy se na obraně proti ROS podílejí také významnou mírou. Zahrnují glutathion, hydrochinon, melatonin, NADPH a další přijímané v potravě jako je  $\beta$ -karoten, riboflavin (vitamin B2), kyselina askorbová (vitamin C),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), lykopen a flavonoidy. Nevýhodou antioxidantů je však to, že zabraňují zničení rakovinných buněk pomocí ROS. (Hrycay a Bandiera, 2015)

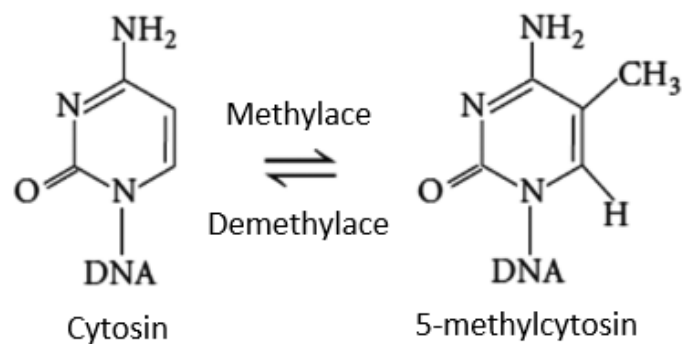
#### **2.5. Methylace**

Methylace DNA je jedna z vratných epigenetických modifikací DNA. Jedná se o velmi stabilní modifikaci. Dochází k ní pomocí enzymatických methyltransferáz (Dnmts). Dnmt1 na DNA přenáší metylovou skupinu ( $\text{CH}_3$ ) z S-adenosylmethioninu. Děje se tomu při replikaci, kdy je potřeba metylovat nově vzniklé dceřiné vlákno DNA podle mateřského. K methylaci může docházet také *de novo*. Ta je zprostředkována Dnmt3a a Dnmt3b, viz obrázek 5. Všechny výše zmíněné methyltransferázy nacházíme u savců.



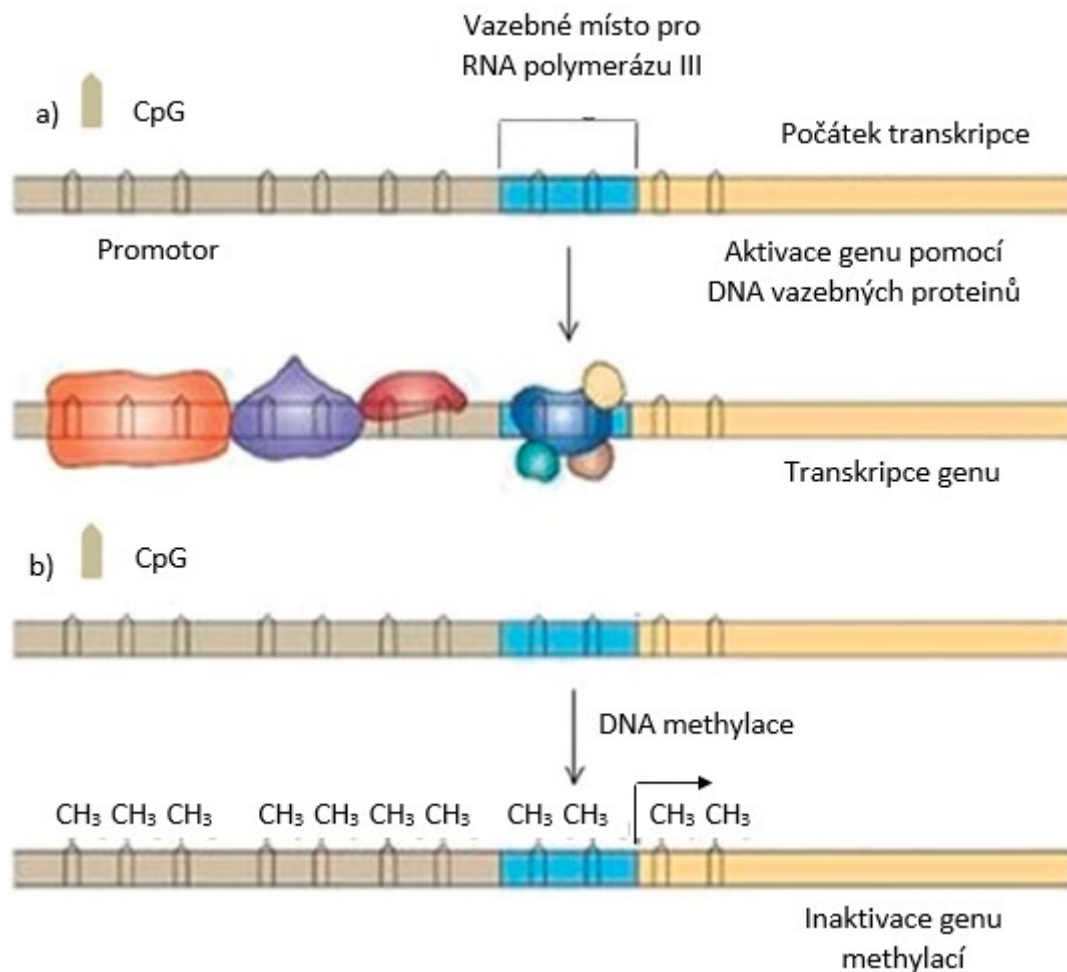
Obrázek 5: a) De novo methylace DNA pomocí Dnmt3a a Dnmt3b.  
b) Methylace dceřinného vlákna DNA při replikaci podle matrice.  
Moore *et al.*, 2013.

Takřka vždy je methylován pátý uhlík cytosinu v dinukleotidu CpG (tzv. CpG ostrůvek), kdy tento dinukleotid obsahuje cytosin a guanin, mezi nimiž je jeden fosfát. Methylací cytosinu vzniká 5-methylcytosin, viz obrázek 6. Mimo to je známa také methylace adenosinu (Wu *et al.*, 2016). CpG ostrůvky se nacházejí hojně v repetitivních sekvencích a oblastech promotoru. Methylace některých CpG ostrůvků souvisí s biologickým věkem jedince. S věkem se methylace DNA mění, a tak je vhodná pro predikci biologického věku.



Obrázek 6: Methylace cytosinu na pátém uhlíku. Z cytosinu vzniká 5-methylcytosin (5mC). Saini *et al.*, 2013.

Methylace promotoru vede k inaktivaci genu. Může zabráňovat nasednutí transkripčních faktorů nebo umožňovat vazbu inhibičního komplexu, který mimo jiné obsahuje histon deacetylázy způsobující kondenzaci DNA, viz obrázek 7.



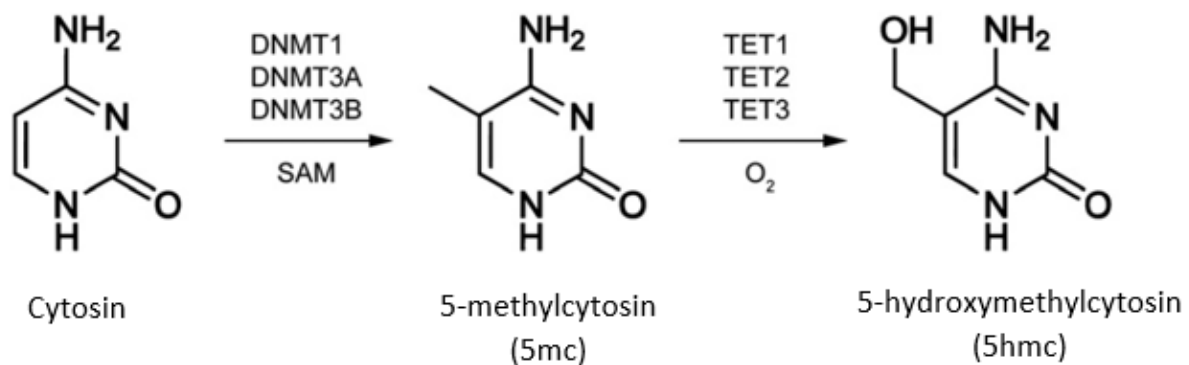
Obrázek 7: Inaktivace genu pomocí methylace. a) Místo pro vazbu RNA polymerázy III na DNA je volné, tudíž je umožněna její vazba a přepis genu. b) Místo pro vazbu RNA polymerázy III je methylováno a RNA polymeráze III není umožněno nasednutí. Dochází k inaktivaci genu. Moraes *et al.*, 2016.

Methylace DNA se také podílí na inaktivaci X chromosomu, genovém imprintingu a potlačení transkripce repetitivních sekvencí. Hraje roli i v karcinogenezi, kdy v rakovinných buňkách dochází k různým demethylacím a *de novo* methylacím. Methylace má proto významný potenciál v diagnostice a terapeutické léčbě (Yi a Tollefsbol, 2011).

## 2.6. Hydroxymethylace

Vedle methylace je významnou modifikací DNA také hydroxymethylace. K hydroxymethylaci dochází pomocí enzymů z rodiny TET, které přemění 5-methylcytosin (5mC) na 5-hydroxymethylcytosin (5hmC). Konkrétně se jedná o TET1, 2 a 3, viz obrázek 8. Vysokou hladinu TET enzymů najdeme

v mozku, kde se účastní regulace diferenciacie nervových buněk a mozkových funkcí, a dále v embryonálních kmenových buňkách.



Obrázek 8: Methylace (pomocí DNMT1, DNMT3A a DNMT3B) a následná hydroxymethylace (pomocí TET1, 2 a 3) cytosinu. Dahl *et al.*, 2011.

Enzymy TET se účastní také demethylace, kdy jsou schopné 5hmC dále oxidovat na 5-formylcytosin a ten dále na 5-karboxylcytosin.

## 2.7. Proteiny s potenciálem ovlivnit stárnutí

Tyto proteiny jsou kódovány tzv. geny dlouhověkosti, k jejichž aktivaci dochází při půstu, cvičení a vystavování se chladným teplotám (Sinclair a LaPlante, 2019).

### 2.7.1. Sirtuiny

Sirtuiny patří mezi enzymy ze skupiny NAD<sup>+</sup> závislých deacetyláz, které jsou schopné deacetylovat lysinové zbytky na amino-koncích histonů a tím modulovat chromatin. Jejich substráty jsou také proteiny nehistonové povahy (Olmos *et al.*, 2011). Deacetylací pomocí sirtuinů dochází ke vzniku nikotinamidu z NAD<sup>+</sup> a acetylované adenosindifosforibózy (Jackson a Denu, 2002). U člověka, stejně jako u ostatních savců, nacházíme 7 sirtuinů (SIRT1-7). Jedná se o homology kvasinkového Sir2. SIRT1, SIRT6 a SIRT7 se nacházejí v jádře buňky. SIRT3, SIRT4, SIRT5 jsou lokalizovány v mitochondriích a SIRT2 je primárně cytosolický. Každý ze sirtuinů má jinou funkci a podílí se na různých dějích, viz tabulka 1 (Li a Kazgan, 2011). Aktivita sirtuinů je řízená buněčným NAD<sup>+</sup>. Jsou inhibovány jejich vlastním produktem nikotinamidem a také NADH (Anderson *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2004). Mají vliv na délku života prostřednictvím metabolismu. Při kalorické restrikci, kdy je snížený příjem glukózy, dochází k prodloužení délky života jednotlivých buněk. Tento proces funguje skrze sníženou glykolýzu, při které je NAD<sup>+</sup> redukováno na NADH. Zvýšeným poměrem NAD<sup>+</sup>/NADH dojde k aktivaci sirtuinů (Lin *et al.*, 2004). U kvasinek bylo vyzkoumáno, že po vyčerpání nikotinamidu, dojde k aktivaci Sir2 a prodloužení životnosti (Anderson *et al.*, 2003). Bylo zjištěno, že při kalorické restrikci z důvodu snížené hladiny NADH, také dochází k aktivaci Sir2 a prodloužení životnosti (Lin *et al.*, 2004). Ukazuje se, že kalorická restrikce prodlužuje život nejen u kvasinek, ale také u dalších modelových organismů jako je *Drosophila Melanogaster* a *Caenorhabditis elegans* (Piper a Bartke, 2008; Li X. *et al.*, 2011).

	Funkce
SIRT1	Energetický metabolismus, stresová odpověď
SIRT2	Buněčný cyklus
SIRT3	Produkce ATP, antioxidantní stres, termogeneze
SIRT4	Sekrece inzulínu, oxidace mastných kyselin
SIRT5	Močovinový cyklus
SIRT6	Opravy DNA, metabolismus, zánět
SIRT7	rDNA transkripce

Tabulka 1: Shrnutí funkcí jednotlivých savčích sirtuinů a dějů, na kterých se podílejí. Li a Kazgan, 2011; Guarente, 2007.

### 2.7.2. mTOR

TOR (target of rapamycin) je vysoce konzervovaná serin/threoninová kináza. U savců se označuje jako mTOR (mammalian target of rapamycin). Je součástí komplexů mTORC1 a mTORC2. V mnohobuněčných organismech reguluje buněčný růst a metabolismus v závislosti na nutrientech, růstových faktorech a energii. Deregulace v signalizaci mění celý buněčný metabolismus a vede k chorobám spojeným se stárnutím. Makrolidové antibiotikum rapamycin inhibuje aktivitu mTORC1. U živočichů mTORC1 reguluje biogenezi ribozomů, syntézu proteinů, transkripci, příjem živin a autofáгии, která je nezbytná pro přežívání buňky (Cornu *et al.*, 2013).

### 2.7.3. FOXO

FOXO (forkhead box O) jsou transkripční faktory. U člověka se vyskytují FOXO1, FOXO3a, FOXO4 a FOXO6. Dokáží zpomalit proces stárnutí tím, že zpomalují buněčný cyklus, odstraňují volné radikály, opravují poškození DNA a indukují autofáгии (Ge *et al.*, 2022).

### 2.7.4. AMPK

AMPK (AMP-aktivovaná protein kináza) se účastní různých signálních drah. Zvyšuje katabolické procesy v těle. Je to hlavní kináza v regulaci autofáגיע. Tu zprostředkovává pomocí fosforylace proteinů spojených s autofáגיעí, jako jsou mTORC1 nebo FOXO. Proto má důležitou roli při stárnutí. AMPK lze aktivovat zvýšením poměru AMP/ATP. K tomu dochází například při nedostatku živin. Aktivace AMPK indukuje také mitofáגיע a aktivuje tumor supresor p53. Dalším aktivátorem je metformin, který se používá k léčbě diabetu. Metformin aktivuje AMPK nepřímo tím, že inhibuje komplex I. respiračního řetězce, čímž se sníží syntéza ATP oxidativní fosforylací. Výsledkem je zvýšení poměru AMP/ATP. Ukázalo se, že metformin dokáže prodloužit život některým modelovým organismům (Ge *et al.*, 2022). Resveratrol také aktivuje AMPK. Reguluje SIRT1, čímž inhibuje ATP syntázu. To opět vede ke zvýšení poměru AMP/ATP a aktivaci AMPK (Kulkarni a Cantó, 2015).

### 3. Životní styl

Ukazuje se, že dravým životním stylem lze předejít mnoha onemocněním, která souvisejí se stárnutím. Zdravý životní styl nám může také prodloužit stáří ve zdraví. Jak již bylo zmíněno, jednou z možností je kalorická restrikce, která aktivuje sirtuiny. Podobně může fungovat půst či přerušovaný půst, který spočívá v konzumaci normálních porcí, mezi nimiž je několikahodinová přestávka (Anton a Leeuwenburgh, 2013). Existuje několik variant přerušovaného půstu:

- 16/8 – konzumace jídla 8 hodin denně a půst 16 hodin denně
- 5:2 – 5 dní v týdnu normální strava, zatímco ve zbylých dvou dnech příjem 500 – 600 kalorií
- 24hodinový půst 1 – 2krát týdně
- Půst obden
- Spontánní vynechání jídla – pokud jsme zaneprázdněni nebo nemáme hlad

Pro ženy je doporučováno zvolit o hodinu kratší interval postění se oproti mužům. Na světě existují místa, kde se lidé dožívají obdivuhodně vysokého věku a jsou zdravější, než lidé žijící jinde. Těmto místům se říká modré zóny. Patří sem japonský ostrov Okinawa, italský ostrov Sardinie, řecký ostrov Ikaria, poloostrov Nicoya v Kostarice a město Loma Linda v Kalifornii. Lidé se zde běžně dožívají 90 či 100 let. Místa poji podobný životní styl, prostředí, ve kterém žijí, nízká míra stresu, zdravý jídelníček s využitím lokálních potravin a udržení fyzické aktivity. Středomořská strava má pozitivní vliv na zdraví, snižuje mortalitu způsobenou kardiovaskulárními a nádorovými onemocněními. Je také prevencí obezity a metabolického syndromu (Di Daniele *et al.*, 2017). Výše zmíněné antioxidanty mají také pozitivní vliv na zdraví. Dále se ukazuje, že vitamin D v prvním trimestru těhotenství pozitivně ovlivňuje délku telomer novorozence (Daneels *et al.*, 2021).

Pravidelná fyzická aktivita je dalším způsobem prevence například obezity, cukrovky, osteoporózy a dalších. Dle doporučení WHO by dospělí jedinci měli strávit 150 – 300 minut aerobní fyzickou aktivitou o střední intenzitě nebo minimálně 75 – 150 minut aerobní fyzickou aktivitou o vysoké intenzitě týdně. Nejenže je fyzická aktivita prospěšná na svaly, srdce a plíce, ale vyvolává také mírný stres, při kterém dochází ke zvyšování hladiny NAD<sup>+</sup> a aktivaci genů dlouhověkosti (Sinclair a LaPlante, 2019). Sirtuiny navíc stabilizují telomery (Amano *et al.*, 2019).

Další součástí zdravého životního stylu, který potenciálně může vést k prodloužení života, je vystavování se rozdílným teplotám a opouštění termoneutralní zóny. To opět představuje určitý stres. Patří sem saunování a otužování, která mají bezesporu mnoho zdravotních benefitů. Otužování podporuje tvorbu hnědé tukové tkáně. V ní dochází ke tvorbě tepla pomocí netřesové termogeneze. Děje se tak pomocí UCPs (rozpřahovací proteiny). Nacházejí se na vnitřní mitochondriální membráně. Způsobují, že protony nejsou přeneseny na ATP-syntázu, ale prochází do mezimembránového prostoru, čímž se tvoří teplo (Caron *et al.*, 2017).

Dle WHO v roce 2008 trpělo v Evropě přes 50% mužů a žen nadváhou a přibližně 23% žen a 20% mužů bylo obézních. Výskyt obezity se mezi lety 1980 a 2008 zdvojnásobil. Častý je výskyt obezity také u dětí. Přes 60% dětí, které jsou obézní před pubertou, bude obézní i v dospělosti. Obezita je spojena s mnoha rizikovými faktory pro vznik hypertenze, kardiovaskulárních onemocnění, diabetu mellitu 2. typu, infarktu myokardu, nádorů, artrózy atd. Obezitě lze mnohdy předejít zdravým životním stylem.

## **4. Komerční využití**

Existuje spousta firem, které provádí genetické analýzy. Jejich nabídky jsou rozmanité. Jednou z možností je analýza genetických předpokladů pro lepší sportovní výkony. Dozvíme se, jak si co nejlépe rozvrhnout trénink, aby nám vyhovoval na míru podle našich genů, i jak co nejefektivněji spalovat tuk. Zjistíme, jaký typ svalových vláken u nás dominuje, a hlavně budeme schopni předcházet zraněním, což souvisí také s regenerační kapacitou (Ferec, 2018).

Můžeme také obdržet jídelníček sestavený na míru podle našich genů. Další analýza nabízí stanovení oxidativního stresu v našich buňkách, jak se naše tělo vypořádává s toxiny a jak je eliminovat. Dále jsou zde různé kosmetické přípravky vyrobené na míru, které cílí na stárnutí pokožky. Zjišťovány jsou i alergie, kdy je testováno více než 100 alergizujících látek. Test probíhá stanovením specifických IgE protilátek v krvi. Obdobně je zjišťována intolerance potravin. Zkoumá se více než 180 potravin pomocí protilátek IgG. Díky genetické analýze je možné alergii odhalit ještě před tím, než dojde k rozvinutí alergické reakce. V nabídce je také stanovení predispozic pro různá onemocnění, kdy se stanovuje genetické riziko hypertenze, trombózy, periodontálního onemocnění, Crohnovy choroby, osteoporózy, revmatické artritidy, ADHD, schizofrenie, deprese, rakoviny prsu, prostaty, plic, kůže, tlustého střeva a další.

V neposlední řadě je spousta diet jako keto dieta, paleo dieta, raw dieta, samozřejmě vegetariánství či veganství nebo dokonce dieta podle krevních skupin.

Je však třeba mít na paměti, že v některých případech může vhodná dieta pomoci, nicméně nejprve musíme uvážit všechna potenciální zdravotní rizika, která mohou nastat, než se rozhodneme pro razantní změnu jídelníčku, a že ne všechna doporučení jsou vědecky podložena.

## **5. Forenzní aplikace**

Výše zmíněné poznatky lze využít ve forenzní a identifikační genetice k predikci biologického věku a snazší identifikaci neznámého jedince při vyšetřování, kdy se okruh podezřelých zúží právě na základě biologického věku (Hewakapuge *et al.*, 2008) nebo k predikci věku zesnulých osob (Correia Dias *et al.*, 2020).

## **5.1. Statistické termíny**

Při predikci biologického věku se často užívají statistické termíny jako korelační koeficient, standardní chyba, průměrná absolutní odchylka. Tyto termíny jsou vysvětleny níže.

### **5.1.1. Korelační koeficient**

Korelační koeficient ( $r$ ) je mírou lineární korelace mezi dvěma soubory dat. Nabývá hodnot od -1 do 1. Hodnota 0 znamená, že mezi veličinami žádná korelace není. Nejčastěji je udáván Pearsonův korelační koeficient, což je podíl kovariance (míry lineární závislosti) veličin a součinu jejich standardních odchylek.

### **5.1.2. Standardní odchylka**

Standardní odchylka je absolutní míra rozptylu hodnot od jejich průměru. Udává, jak moc se hodnoty v souboru mezi sebou liší. Vypočítá se jako druhá odmocnina rozptylu. Čím je standardní odchylka větší, tím více se hodnoty odlišují.

### **5.1.3. Rozptyl**

Rozptyl udává, jak jsou hodnoty ve statistickém souboru rozptýleny. Lze ho vypočítat jako aritmetický průměr druhých mocnin vzdáleností jednotlivých hodnot od jejich průměru.

### **5.1.4. Standardní chyba**

Standardní chyba (SE) udává míru statistické přesnosti a spolehlivosti odhadu. Používá se především k testování hypotéz, kdy máme data zatížena výběrovou chybou. To znamená, že nezkoumáme celou populaci, ale pouze vzorek několika jedinců. Vypočítá se jako poměr standardní odchylky a druhé odmocniny velikosti vzorku. Čím menší je standardní chyba, tím přesnější je odhad.

### **5.1.5. Průměrná absolutní odchylka**

Průměrná absolutní odchylka (MAD) udává průměr absolutních odchylek jednotlivých hodnot od jejich aritmetického průměru. Pro výpočet MAD je nutno nejdříve vypočítat průměr získaných hodnot, dále najít absolutní odchylku každé hodnoty od průměru (odečtením jednotlivých hodnot od jejich průměru a převedením na absolutní hodnotu). Nakonec tyto absolutní odchylky zprůměrujeme.

### **5.1.6. Střední absolutní odchylka**

Výpočet střední absolutní odchylky je téměř shodný s výpočtem průměrné střední odchylky. Liší se pouze v tom, že místo průměru se použije medián.

## **5.2. Metody predikce biologického věku**

### **5.2.1. Racemizace kyseliny asparagové**

Při proteosyntéze u savců dochází k zařazování pouze L-aminokyselin do vznikajícího řetězce polypeptidu. S přibývajícím věkem roste chemická nestabilita aspartátových a asparaginylových zbytků, a tak se spontánně mění na D- izomery (Bartosz, 1996). Vhodnou tkání pro tuto metodu je zubní dentin

(Meissner a Ritz-Timme, 2010). Množství D-asparagové kyseliny roste v zubech s přibývajícím věkem téměř lineárně (Helfman a Bada, 1976).

Ohtani, 1995 stanovil poměr D/L izomerů kyseliny asparagové pomocí plynové chromatografie. Porovnával poměr longitudinální a transverzální. Větší korelace mezi D/L a věkem byla zjištěna u longitudinálního segmentu ( $r = 0,995$ ). Chyba v predikci se pohybovala mezi -2 až +3 roky. Aby bylo dosaženo reprodukovatelnosti metody, je nutná kompletní separace D- a L- izomerů.

Mimo dentinu je vhodný také purifikovaný elastin, který byl zkoumán ve studii Ritz-Timme *et al.*, 2003. Korelace mezi poměrem D/L izomerů a biologického věku se podobá korelaci zjištěné u Ohtani, 1995 ( $r = 0,96 - 0,99$ ).

Přestože se metoda predikce biologického věku pomocí racemizace kyseliny asparagové jeví jako slibná, má své problémy. V první řadě musí být veškeré kroky standardizovány, především procesy závislé na teplotě, aby bylo možno porovnávat výsledky jednotlivých studií. Vzorek proteinu musí být purifikovaný (Meissner a Ritz-Timme, 2010). Pro správnou predikci nesmí být v zubu přítomny kazy (Griffin *et al.*, 2008). Dále u starších jedinců dochází k větším chybám v predikci a lze takto predikovat věk pouze u zesnulých osob nebo u osob, u kterých byly zuby chirurgicky získány při zubním ošetření. Proto není tato metoda zcela vhodná pro širší využití. Nicméně lze ji uplatnit při odhadování stáří kosterních pozůstatků, které nejsou starší než 50 let. I přesto však spolehlivost silně závisí na podmínkách *post mortem* (Meissner a Ritz-Timme, 2010).

### 5.2.2. Konečné produkty pokročilé glykace

Konečné produkty pokročilé glykace (AGEs) jsou heterogenní skupina látek, která vzniká neenzymatickou glykací. Dochází ke spojování volných aminoskupin bílkovin, lipidů a nukleových kyselin s karbonylovými skupinami redukujících cukrů, tzv. Maillardova reakce (Meissner a Ritz-Timme, 2010). Reakce indukují uvolnění  $H_2O_2$ , čímž se zvyšuje oxidativní stres. Má za následek také odpověď na zánět a nejspíše se podílí na regulaci genové exprese (Nass *et al.*, 2007). AGEs jsou charakteristické svou žlutohnědou pigmentací a fluorescencí, které se využívá ke stanovení jejich množství. To se zvyšuje během stárnutí v různých tkáních, mezi které lze zahrnout čočku, chrupavku, kožní kolagen, perikardiální tekutinu a pyramidové buňky centrální nervové soustavy (Meissner a Ritz-Timme, 2010).

Ve studii Pilin *et al.*, 2007 se zaměřili na meziobratlové ploténky, Achillovy šlachy a žebrové chrupavky. V těchto tkáních dochází během života ke změnám v barvě. Vzorky se skládali ze 151 meziobratlových plotének, 163 Achillových šlach a 52 žebrových chrupavek. Výsledky potvrzují změny v barvě některých tkání v závislosti na věku jedince. AGEs pohlcují modrou barvu, proto se jeví jako žluté. Množství modré barvy můžeme detekovat a určit tak korelaci mezi modrou barvou a věkem. Barva se mění z bílé (15 – 20 let) přes žlutou (lidé ve středním věku) až na žlutohnědou. Největší korelace mezi změnami barvy a věkem byla zaznamenána u žebrových chrupavek ( $r = -0,87$ ), o něco menší byla

u meziobratlových plotének ( $r = -0,82$ ) a u Achillových šlach byla nejnižší ( $r = -0,47$ ). To nejspíše závisí na množství proteoglykanů, jež jsou nejvíce zastoupeny právě v žebrových chrupavkách.

Sato *et al.*, 2001 zkoumali AGEs v hipokampu. Mozková tkáň byla získána od 31 jedinců (10 mužů a 21 žen), kteří netrpěli diabetem, neurologickými poruchami, ani Alzheimerovou chorobou. Hipokampus byl oddělen v intervalu 8 – 72 h *post mortem*. Pomocí imunohistochemických metod byly AGEs v pyramidálních buňkách detekovány slabě u mladých jedinců (18 let), imunoreaktivita byla vyšší u 48letého jedince a silné signály byly zachyceny u 86letého jedince. Tyto výsledky naznačují spojení mezi akumulací AGEs a stárnutím centrální nervové soustavy ( $r = 0,91$ ). Věk lze vypočítat pomocí rovnice

$$\text{věk} = 198,5x - 200,7 \quad (4)$$

kde  $x$  = průměrná hustota barvení.

Predikce biologického věku pomocí AGEs může fungovat u zesnulých osob, kde nelze ostatní metody aplikovat nebo se zachovala jen část těla. Nicméně nevýhodou je, že od 45 let věku jedince vykazuje metoda nepřesnosti. U onemocnění jako například Alzheimerova choroba se AGEs akumuluji s větší rychlostí, a tak nelze spolehlivě predikovat věk u jedinců s těmito onemocněními (Sato *et al.*, 2001).

### 5.2.3. Mitochondriální delece

Jednou z nejčastějších mitochondriálních delecí je 4977 bp delece, známá také jako common deletion. Nejprve byla pozorována u mitochondriálních mitopatií Kearns-Sayrerova syndromu (Zeviani *et al.*, 1988) a chronické progresivní externí oftalmoplegie (Shoffner *et al.*, 1989). U těchto onemocnění se v buňkách nachází jak deletovaná mtDNA, tak normální mtDNA. Tento jev se nazývá heteroplasmie. Deletovaná mtDNA může být detekována pomocí metody Southern blot, kdy deletovaná mtDNA putuje elektroforetickým gelem rychleji než normální mtDNA. Kolem 40. roku života je zastoupení 4977 bp delece přibližně 0,00015% a zvyšuje se na 0,0035% kolem 80. roku života. Zato pacienti s ischemickou chorobou srdeční vykazují až 0,85% deletované mtDNA a pacienti s jinými srdečními onemocněními až 0,16% (Corral-Debrinski *et al.*, 1991).

### 5.2.4. Délka telomer

S každým buněčným dělením dochází ke zkracování telomer (Olovnikov, 1973), a tak se jejich délka liší u jedinců různého věku, což může umožnit odhadnout věk jedince na základě jejich délky.

#### 5.2.4.1. TRF

Nejprve se pro stanovení délky telomer používala TRF (terminální restrikční fragment) metoda. Metoda probíhá tím způsobem, že dochází ke štěpení DNA enzymy v restrikčních místech, jež se nacházejí v subtelomerických oblastech. Poté se změří délka vzniklého fragmentu od místa pro restrikční štěpení do konce chromozomu. Stanovuje se průměrná délka TRF. Metoda je aplikovatelná na jedince jakéhokoliv věku, nicméně nevýhodou je, že TRF se liší v jednotlivých tkáních jednoho jedince. Tato

metoda je vhodná pro získání přibližné korelace mezi průměrnou délkou TRF a biologickým věkem jedince (Tsuji *et al.*, 2002). U každého chromozomu v buňce se ale délka TRF liší (Martens *et al.*, 1998).

Ve studii Tsuji *et al.*, 2002 bylo využito této metody k predikci biologického věku jedinců. Autoři provedli analýzu vzorků periferní krve 60 zdravých Japonců ve věku 0 – 85 let. Pro restriční štěpení byly použity enzymy *HinfI* a *RsaI*. Bylo zjištěno, že TRF mají tendenci se s věkem zkracovat. Korelační koeficient činil 0,832. Standardní chyba dosáhla hodnoty 7,037. Biologický věk jedince lze tedy vypočítat podle rovnice

$$\text{věk} = -0,0095y + 148,9 \pm 7,037, \quad (5)$$

kde  $y$  = průměrná délka TRF; 7,037 = standardní chyba.

Nejtvrdší tkání lidského těla jsou zuby, které ve své dřeni zachovávají podstatné množství DNA. Takasaki *et al.*, 2003 použili k predikci biologického věku právě zubní dřev. DNA byla získána ze zdravých molárů 100 Japonců ve věkovém rozmezí 16 – 70 let. Od 4 osob z celé skupiny byly získány 2 moláry od každého, tudíž jeden z nich byl uschován po dobu jednoho roku při pokojové teplotě (22°C). Ke štěpení DNA byly opět použity *HinfI* a *RsaI* stejně jako v předchozí studii. Průměrná délka TRF se s přibývajícím věkem snižovala. Korelační koeficient byl stanoven na 0,749. Standardní chyba činila 7,52 let. Biologický věk lze vypočítat pomocí rovnice

$$\text{věk} = -0,0119y + 168 \pm 7,52, \quad (6)$$

kde  $y$  = průměrná délka TRF; 7,52 = standardní chyba.

Stanovena byla také délka TRF ze 4 zubů po dobu jednoho roku. TRF po jednom roce se lišila od TRF stanovené ze zubů ihned po jejich získání. Rozdíl byl 10 – 952 bp. Podle stanovené rovnice byl dále vypočítán biologický věk u 15 případů soudní pitvy. Vypočítaný věk 12 z nich byl v mezích standardní chyby, zbylé 3 nikoliv, viz tabulka 2.

Případ	Doba <i>post mortem</i> (dny)	Vypočítaný věk	Skutečný věk	Příčina úmrtí
1	0,5	43,5±7,52	48	Otrava oxidem uhelnatým
2	0,5	52,0±7,52	57	Bodné rány
3	1,0	42,6±7,52	45	Uškrcení
4	1,0	48,7±7,52	53	Otrava amfetaminem
5	1,0	65,8±7,52	61	Poranění hlavy
6	1,5	37,1±7,52	31	Otrava amfetaminem
7	1,5	44,0±7,52	48	Otrava amfetaminem
8	1,5	69,7±7,52	65	Poranění hlavy
9	3,0	35,4±7,52	28	Uškrcení
10	4,0	37,4±7,52	31	Astma

11	4,0	63,3±7,52	61	Utonutí
12	6,0	35,3±7,52*	17	Utonutí
13	7,0	42,3±7,52	49	Poranění hlavy
14	7,0	76,0±7,52*	51	Utonutí
15	7,0	46,3±7,52*	35	Utonutí

Tabulka 2: Tabulka uvádí 15 případů soudní pitvy. U každého je uvedena doba *post mortem*, příčina úmrtí, skutečný věk v době úmrtí a vypočítaný věk podle rovnice (6), \* označuje hodnoty, které překročily standardní chybu, jedná se o případy, kdy příčina úmrtí bylo utonutí a také uběhla delší doba *post mortem*, tudíž predikce není tak přesná. Takasaki *et al.*, 2003.

U všech tří hodnot predikovaného věku, které překročily standardní chybu, bylo příčinou smrti utonutí a uplynula delší doba *post mortem* (6 – 7 dní). Je tedy možné, že v těchto případech zkracování telomer bylo ovlivněno vnějšími faktory prostředí, a proto zde nelze biologický věk predikovat s takovou spolehlivostí. Model se však uplatní pro přibližnou predikci biologického věku v době úmrtí.

TRF metoda má řadu limitací, mezi které patří potřeba velkého množství DNA v jednom vzorku od daného jedince (0,5 – 5 µg). Přičemž množství DNA nalezené na místě trestného činu získané z otisků prstů se může pohybovat i v setinách, desetínách či pár jednotkách ng (Raymond *et al.*, 2009). Dalším omezením je nepříznivá časová náročnost (3 – 5 dnů) Z těchto důvodů je tedy výhodnější PCR. Ta vyžaduje menší množství DNA a redukuje čas potřebný pro analýzu. Do analýzy pomocí TRF je také zahrnuta část subtelomerických oblastí, kdežto u PCR měříme pouze telomery samotné, tedy jen sekvenci TTAGGG. V těchto oblastech se mohou vyskytovat různé polymorfismy v místě restričního štěpení (Cawthon, 2002). Subtelomerické oblasti při PCR zahrnuté nejsou, čímž se může zvýšit přesnost predikce (Hewakapuge *et al.*, 2008). U PCR lze také dosáhnout lepší reprodukovatelnosti než u TRF (Márquez-Ruiz *et al.*, 2018).

#### 5.2.4.2. PCR

Nicméně i PCR má svá omezení. Jedno z hlavních, se kterým se musíme potýkat při analýze telomer, je navržení vhodných primerů pro reakci. Jelikož templátové sekvence telomer jsou TTAGGG a CCCTAA, k nim navržené primery by tvořily dimery a znemožnily by tak PCR. Cawthon, 2002 ale přišel na způsob navržení primerů, které nebudou PCR omezovat. Primery jsou k sekvenci telomer pouze částečně komplementární. Každá šestá báze komplementární není. Posledních 5 bází na 3' konci je k templátu zcela komplementární. Na 5' konci se nachází 6 nekomplementárních bází. Při vzájemném spojení primerů, nedojde k syntéze, jelikož poslední báze na jejich 3' konci je taková báze, aby po přidání první báze podle templátu, došlo následně k zastavení syntézy z důvodu nestability těchto dvou bází. Díky tomu nevzniká produkt podle dimeru primerů. Je zajištěno, že produkt vzniká pouze, pokud primer nasedl na templát, nikoliv na druhý primer. Cawthonovy primery se rozšířily a začaly se běžně používat.

Ve studii Karlsson *et al.*, 2008 byla provedena analýza délky telomer z krevních vzorků pomocí kvantitativní real-time PCR (polymerase chain reaction). Bylo zjištěno, že míra zkracování telomer je

jiná u různých jedinců. SE predikce byla přibližně 22 let, což je příliš vysoké číslo a pro forenzně genetické účely je tato metoda nevyužitelná. Navíc studie odhalila lišící se délku telomer v různých tkáních jedince. Zkoumány byly krevní vzorky a bukální epitel. U krevních buněk byly telomery kratší než u buněk bukálního epitelu, což je nejspíše zapříčiněno tím, že krevní buňky mají delší životnost, zatímco buňky bukálního epitelu se obnovují z kmenových buněk. Velký rozdíl v délce telomer byl zjištěn u jedinců přibližně stejného věku. To může být vysvětleno mnoha faktory, které ovlivňují délku telomer. Mezi ně patří oxidativní stres a účinnost antioxidační ochrany, životní styl, onemocnění a také různá zděděná délka telomer.

Obdobnou studii provedl Hewakapuge *et al.*, 2008. Zde měřili délku telomer buněk bukálního epitelu 167 jedinců ve věku 1 – 96 let, taktéž pomocí kvantitativní real-time PCR. Dospěli k závěru, že s přibývajícím věkem dochází k nelineárnímu zkracování telomer ( $r = -0.185$ ). Telomery některých starších jedinců byly delší než telomery jedinců mladších. Nejkratší telomery byly objeveny u 26leté ženy, zatímco nejdelší u ženy 27leté. Následně byli jedinci rozděleni do věkových skupin po 10 letech. Neukázalo se, že by byl signifikantní rozdíl v délce telomer mezi jednotlivými skupinami. Proto dále autoři rozdělili jedince do dvou skupin na mladší (1 – 39 let) a starší (40 – 89 let). Zde byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi délkami telomer těchto dvou skupin. Stejně jako Karlsson *et al.*, zjistili, že v délce telomer stejně starých jedinců, nalezneme velkou variabilitu, tudíž nelze spolehlivě predikovat biologický věk jedince na základě délky telomer. Studie také ukázala rychlejší zkracování telomer u mužů než u žen. Přesnost predikce byla přibližně 4%, což je příliš málo. Pro forenzní využití je nutná přesnost okolo 70%. Vztah pro výpočet biologického věku je

$$\text{věk} = (\text{relativní telomerová délka} - 1,5) / -0,005, \quad (7)$$

kde relativní telomerová délka =  $T/S$ ,

přičemž  $T$  = absolutní koncentrace telomerové hexamerické repetice;

$S$  = absolutní koncentrace genu 36B4.

Další studie (Márquez-Ruiz *et al.*, 2018) se zabývala stanovením biologického věku na základě délky telomer DNA izolované ze zubů. Tuto metodu lze využít u zesnulých osob. Zuby jsou díky jejich umístění v čelisti odolné vůči vnějším podmínkám (teplota, vlhkost a pH). Dochází v nich také k pomalejší degradaci DNA, tudíž z nich lze izolovat DNA o větším množství a často ve větší kvalitě a s menším množstvím kontaminující DNA než při izolaci z kostí (Rubio *et al.*, 2009). DNA byla získána z 91 zubů patřících 77 jedincům ve věku 15 – 85 let. Větší množství DNA než v ostatních zubech bylo detekováno v molárech. Bylo zjištěno, že telomery se s přibývajícím věkem zkracují a to více u mužů. Avšak někteří mladší jedinci měli telomery kratší než někteří starší jedinci. SE činila  $\pm 13,18$  let, což je pro forenzní využití příliš.

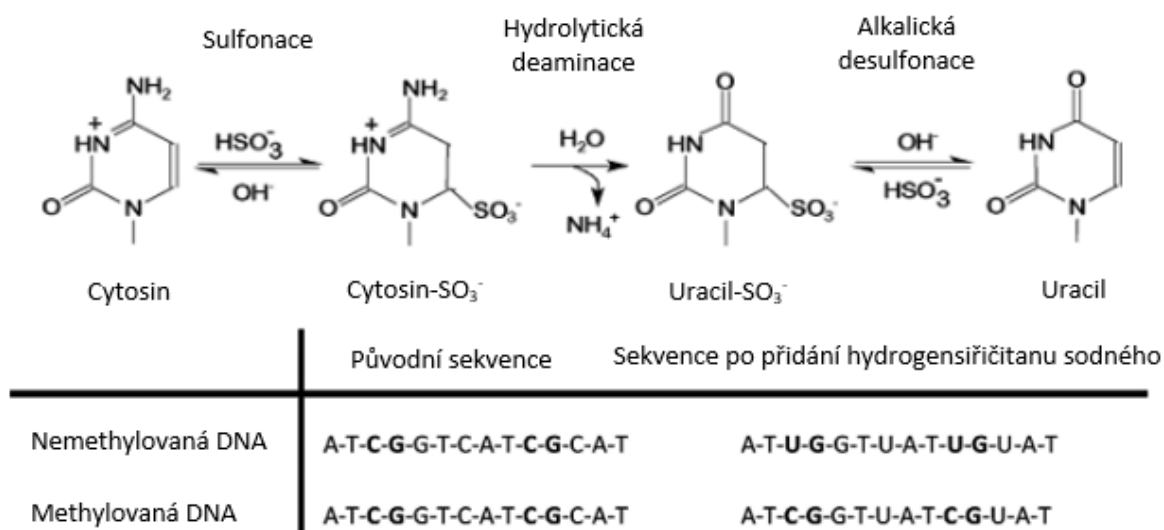
Predikce biologického věku jedince na základě stanovení délky telomer se jevila jako nadějná, nicméně tento fenomén je velmi komplexní a je ovlivněn mnoha faktory, tudíž pro forenzní využití není zcela

vhodný. Proto je nutno nalézt jiné možnosti, jak biologický věk stanovit spolehlivěji. Navíc u jednotlivých metod chybí standardizace.

### 5.2.5. Methylace DNA

Dalším způsobem, jak stanovit biologický věk jedince je podle methylace DNA a to pomocí různých markerů, které s přibývajícím věkem vykazují pozitivní či negativní korelaci.

Ke stanovení methylace genů se standardně využívá bisulfitové sekvenování. To je dáno především kvalitou a kvantitou jeho výstupů a také jeho účinností. Díky bisulfitovému sekvenování detekujeme methylaci DNA na úrovni jednotlivých bází. Probíhá tím způsobem, že DNA je nejprve denaturována, aby se dvojitá vlákna rozdělila na jednotlivá vlákna. Poté přichází na řadu přidání hydrogensířičitanu sodného ( $\text{NaHSO}_3$ ), což způsobí, že cytosin, který methylován není, se změní na uracil. Cytosin, který je methylován, zůstává beze změny. Reakce, kdy se cytosin změní na uracil, se nazývá bisulfitová konverze. Probíhá ve třech krocích: sulfonace, hydrolytická deaminace a alkalická desulfonace, viz obrázek 9 (Frommer *et al.*, 1992; Li a Tollefsbol, 2011).



Obrázek 9: Po přidání hydrogensířičitanu sodného k DNA dochází u nemethylovaného cytosinu k bisulfitové konverzi. Reakce probíhá přes sulfonaci, hydrolytickou deaminaci a alkalickou desulfonaci. Během těchto kroků se cytosin změní na uracil. Methylovaný cytosin zůstává beze změny. Kombinace dvou obrázků Kirstensen a Hansen, 2009 a Active Motif's Bisulfite Conversion Kit Manual.

Po bisulfitové konverzi následuje PCR, při které se na místo uracilu zařazuje thymin. Výsledkem tedy je nahrazení nemethylovaného cytosinu thyminem. Následně lze porovnat tuto sekvenci se sekvencí původní a zjistíme, že methylace se vyskytuje na místech, kde se objevil thymin (Frommer *et al.*, 1992; Li a Tollefsbol, 2011).

Bocklandt *et al.*, 2011 se zabývali výzkumem monozygotických dvojčat. Ta jsou vhodným modelem pro studium methylace v průběhu života. Při oddělení embryí je jejich methylační vzorec téměř identický. Během života dochází ke změnám v methylaci v závislosti na genetických faktorech, vnějším

prostředí a stochastických jevech. V této studii byla stanovena methylace 27 578 CpG ostrůvků ze vzorků slin monozygotických dvojčat ve věku 21 – 55 let. Byla zjištěna silná korelace u 88 lokusů, z nichž 19 korelovalo s věkem negativně a 69 pozitivně. Jde především o geny spojené s kardiovaskulárními chorobami a neurologickými a genetickými onemocněními. Data byla validována na 22 vzorcích slin dvojčat, 31 vzorcích nepříbuzných mužů a 29 vzorcích nepříbuzných žen ve věku 18 – 70 let. Silná korelace s věkem byla zjištěna u *EDARADD* (EDAR associated death domain), *NPTX2* (neuronal pentraxin 2) a *Tom1L1* (target of myb1 like 1 membrane trafficking protein) (všechny názvy genů byly čerpány z HUGO Gene Nomenclature Committee, © 2021). Methylace *NPTX2* je upregulována při rakovině pankreatu, tudíž lze tento marker využít také pro molekulárně diagnostické účely (Park *et al.*, 2007). Korelace pro jednotlivé geny: *EDARADD* ( $r = 0,96$ ), *NPTX2* ( $r = 0,92$ ) a *Tom1L1* ( $r = 0,90$ ). Korelace methylace a věku všech těchto genů byla zjištěna jak u dvojčat, tak u mužů. U žen s věkem silně korelovaly *EDARADD* a *Tom1L1*, ale *NPTX2* nikoliv. Chyba v predikci (absolutní rozdíl mezi predikovaným a chronologickým věkem) činila 5,3 let pro mužský model, 6,2 pro ženský a 5,2 pro kombinovaný. Přidání genu *ELN* (elastin) k modelu zvýšilo jeho přesnost. Chyba predikce se snížila na 3,5 let.

Garagnani *et al.*, 2012 zkoumali krevní vzorky 64 jedinců různého věku a to matek a jejich potomků. Věk matek se pohyboval v rozmezí 42 – 83 let a potomků v rozmezí 9 – 52 let. Zaměřili se na geny *ELOVL2* (ELOVL fatty acid elongase 2), *FHL2* (four and a half LIM domains 2) a *PENK* (proenkephalin). Výsledky byly potvrzeny na 501 vzorcích jedinců ve věku 9 – 99 let včetně 7 vzorků pupečnickové krve. CpG ostrůvky lokalizované v promotoru genů jsou u matek vůči jejich potomkům hypermethylovány. Největší korelace s věkem byla zjištěna u *ELOVL2* ( $r = 0,92$ ), jehož míra methylace dosahovala 7 – 91%. U *FHL2* se míra methylace pohybovala v rozmezí 12 – 53% a u *PENK* byl rozdíl nejmenší (1 – 27%).

Gen *ELOVL2* kóduje transmembránový protein pro syntézu dlouhých (C22 a C24)  $\omega 3$  a  $\omega 6$  polynenasycených mastných kyselin (PUFA). PUFA jsou nezbytné v mnoha procesech jako produkce energie, modulace zánětu a zachování integrity buněčných membrán, z čehož je možné vyvodit, že *ELOVL2* hraje roli ve stárnutí prostřednictvím regulace různých biologických drah. Na základě zjištěných výsledků je patrné, že *ELOVL2* je silným markerem a lze ho využít pro predikci věku jedince. Hypermethylace *ELOVL2* je také slibným markerem pro potenciální včasné odhalení nemocí spojených s přibývajícím věkem a monitorování terapeutických zákroků či průběhu onemocnění (Leonard *et al.*, 2002). *ELOVL2* je také společně s *FADS1* (fatty acid desaturase 1) a *FADS2* (fatty acid desaturase 2) dáván do souvislosti s autismem. U *ELOVL2* nacházíme různé jednonukleotidové polymorfismy. Jedinci s alelami rs17606561, rs3756963 a rs9468304 mají větší riziko autismu (Sun *et al.*, 2018). Dále je *ELOVL2* spojován také s obezitou. Byla vyzkoumána pozitivní korelace mezi recesivní alelou rs2236212 *ELOVL2* a BMI (body mass index) jedince. Recesivní alela významným způsobem redukuje enzymatickou aktivitu elongázy 2, kterou kóduje, a má za následek vyšší BMI. Dochází ke změnám

v syntetických drahách PUFA. To vede k nevyváženému poměru  $\omega 3$  a  $\omega 6$  PUFA. Alela rs2236212 přispívá k obezitě, která může vést k dalším komplikacím jako dyslipidémie, diabetes mellitus 2. typu a kardiovaskulární onemocnění (Maguolo *et al.*, 2021).

Horvath v roce 2013 popsal v různých tkáních 353 CpG ostrůvků, které tvoří epigenetické hodiny. Z nich 193 pozitivně koreluje s věkem a jsou hypermetylovány, zatímco zbylých 160 koreluje s věkem negativně a jsou hypometylovány. Byla zanalyzována data o methylaci 8000 vzorků z 51 různých tkání a buněčných typů. Bylo zjištěno, že změny v methylaci DNA probíhají rychleji během růstu a vývoje organismu. Nejvíce do jednoho roku života. Tedy že epigenetické hodiny tikají zpočátku rychle, po jednom roce života se zpomalují a po skončení puberty tikají konstantní rychlostí. Model lze použít na řadu tkání: krev, sliny, buňky epitelu, mozek, tlusté střevo, tuková tkáň, játra, plíce, děložní čípek a také konkrétní buněčné linie zahrnující CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty, CD14<sup>+</sup> monocyty a imortalizované B-lymfocyty. Výhodou tohoto modelu je jeho použití napříč spektrem tkání a jeho vysoká přesnost. Nicméně proveditelnost kvůli takovému množství markerů může být složitější.

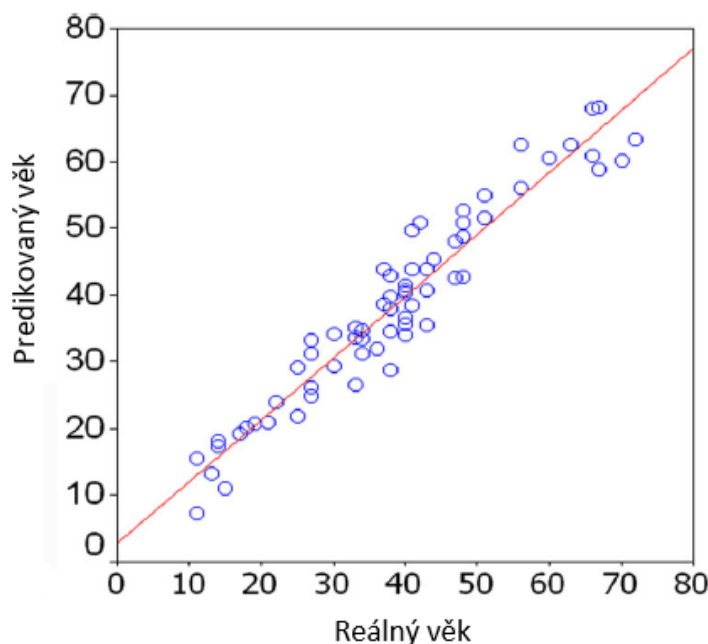
Jedním z markerů, který vykazuje silnou korelaci s věkem, je gen *ELOVL2*, který byl podrobně zkoumán ve studii Zbiec-Piekarska *et al.*, 2015. Autoři se zaměřili na 7 CpG ostrůvků lokalizovaných na promotoru tohoto genu. Bylo zkoumáno 303 krevních vzorků jedinců ve věkovém rozmezí 2 – 75 let. Finální model pro predikci věku byl sestaven z kombinace dvou CpG ostrůvků *ELOVL2* (C7 a C5), přičemž SE činila 6,85 let a MAD 5,03. Při rozdělení souboru jedinců do věkových kategorií (0 – 19, 20 – 39, 40 – 59 a 60 – 80 let) bylo zjištěno, že model je přesnější u mladších jedinců. V kategorii 60 – 80 let se vyskytovalo nejvíce chyb v predikci. Ve věkové skupině 2 – 39 let vysvětluje 80 % variability. Methylace ostrůvku C7 se různila od 26 % u dvouletých jedinců do 80 % u 75letých jedinců. Stejných výsledků bylo dosaženo i při skladování vzorků v pokojových podmínkách po dobu 5 let. Je tedy možné model získaný z krevních vzorků aplikovat na krevní stopy při forenzním vyšetřování. *ELOVL2* je spolehlivým markerem, nicméně je potřeba doplnit ho ještě o nějaké další pro zvětšení přesnosti predikce.

V roce 2015 Yi *et al.* provedli studii, ve které izolovali a identifikovali tři fragmenty DNA (P1 – P3), u kterých dochází k methylaci související s věkem. Izolovány byly z krve 40 dárců. Výsledky byly ověřeny na 65 jedincích z běžné populace, jejichž věk se pohyboval v rozmezí 11 – 72 let. Methylace těchto tří markerů koreluje s věkem lineárně. Fragmenty mají 100% homologii s těmito lidskými geny: *USP11* (ubiquitin specific peptidase 11), *NOP14* (NOP14 nucleolar protein) a *ZIC5* (Zic family member 5). U každého je jiný počet CpG ostrůvků a každý vykazuje s věkem jinou míru methylace. Byl objeven značný rozdíl v methylaci některých CpG ostrůvků těchto fragmentů u mladších a starších jedinců. Důležité je, že nebyly pozorovány velké rozdíly u jedinců stejné věkové kategorie. Fragmenty vykazují tyto korelace: P1 ( $r = -0,88$ ), P2 ( $r = -0,85$ ) a P3 ( $r = 0,80$ ). Celková korelace pro daný model je 0,96. Průměrná chyba mezi predikovaným a reálným věkem je 4 roky, viz obrázek 10. Pokud model rozdělíme

na mužský a ženský, chyba činí 4,7 a 2,9 let. Přesnost této metody je založena na vyhodnocení všech tří fragmentů dohromady. Pro výzkum byla vybrána periferní krev kvůli jejímu častému výskytu na místech trestných činů. Tento model se jeví jako relativně přesný, a tak by mohl najít využití při predikci biologického věku pro forenzní účely. Biologický věk lze vypočítat pomocí rovnice

$$\text{věk} = 103,007 - 49,205 \times M_{p1} - 71,875 \times M_{p2} + 67,645 \times M_{p3} \quad (8)$$

kde  $M_{p1}$ ,  $M_{p2}$ ,  $M_{p3}$  jsou průměrná procenta methylace fragmentů P1, P2 a P3.



Obrázek 10: Predikovaný vs. reálný věk. Průměrná chyba činí 4 roky. Yi *et al.*, 2015.

Jiné markery byly vybrány ve studii Park *et al.*, 2016. Protože se gen *ELOVL2* jevil jako nadějný marker (Garagnani *et al.*, 2012; Zbiec-Piekarska *et al.*, 2015), snažili se ho autoři doplnit o nějaké další, které by predikci věku zpřesňovali. Byla zkoumána data 765 krevních vzorků Korejců ve věkovém rozmezí 1 – 101 let. Na základě 535 vzorků byl vyvinut model pro predikci biologického věku. Zbýlých 230 bylo použito pro validaci modelu. Zjištěné CpG ostrůvky, jejichž methylace korelovala s věkem, jsou spojeny s vývojem a morfogenezí. Jejich distribuce se mírně liší u mužů a u žen. Byly vybrány markery *ELOVL2*, *ZNF423* (zinc finger protein 423) a *CCDC102B* (coiled-coil domain containing 102B). U *ZNF423* a *CCDC102B* dochází s přibývajícím věkem k hypomethylaci, zatímco je *ELOVL2* hypermethylován. Byla stanovena korelace jednotlivých CpG ostrůvků těchto genů: *ELOVL2* CpG\_01 ( $r = 0,9352$ ), *ZNF423* CpG\_01 ( $r = -0,7769$ ) a *CCDC102B* CpG\_01 ( $r = -0,9061$ ). Kombinací těchto tří markerů bylo dosaženo větší přesnosti predikce. SE byla vypočítána na 6,32 a MAD na 3,156 let. Výsledky dále ukazují, že přesnost predikce byla nižší u skupiny nad 60 let oproti skupině mladší 60 let. Díky vysoké přesnosti tohoto modelu, mohou být tyto tři markery dále využity pro forenzní genetiku. Biologický věk lze vypočítat pomocí vztahu

$$\text{věk} = 39,73167 + \text{ZNF423 (CpG}_{01}) \times -0,28914 + \text{ELOVL2 (CpG}_{01}) \times 1,19242 + \text{CCDC102B (CpG}_{01}) \times -0,69994. \quad (9)$$

*ELOVL2* byl dále zkoumán také ve studii Correia Dias *et al.*, 2020 společně s geny *FHL2*, *EDARADD* a *PDE4C* (phosphodiesterase 4C). U každého genu se jednalo o více CpG ostrůvků. Odebráno bylo 53 krevních vzorků zdravých Portugalců, z toho 35 osob ženského pohlaví a 18 osob mužského pohlaví ve věku 1 – 95 let. Úroveň methylace byla vyhodnocena pomocí bisulfitového PCR sekvenování. Reprodukovatelnost sekvenování byla ověřena na 10% vzorků. Rozdíl v úrovni methylace pro všechny CpG ostrůvky činil 6,5% pro *PDE4C*, 4,3% pro *EDARADD*, 2,9% pro *ELOVL2* a 3,9% pro *FHL2*. Nejsilnější korelace s věkem byla zjištěna u CpG6 *ELOVL2*. Predikovaný věk byl vypočítán pomocí lineární regrese s MAD 8,01 pro *ELOVL2*, 7,81 pro *FHL2* CpG3, 10,57 pro *EDARADD* CpG3 a 11,87 pro *PDE4C* CpG2. Kombinací těchto CpG ostrůvků byl sestaven multilokusový model pro predikci věku (APM). Predikovaný věk silně koreloval s biologickým ( $r = 0,972$ ). MAD od chronologického věku činila 5,35 let. Jedinci byli dále rozděleni do věkových kategorií (< 18 let, 18 – 39 let, 40 – 60 let, > 61 let). Větší rozdíly mezi predikovaným a chronologickým věkem (vyšší MAD) byly pozorovány s přibývajícím věkem, stejně jako u Park *et al.*, 2016. U dvou starších věkových kategorií byla také přesnost predikce nižší než ve dvou mladších věkových kategoriích, viz tabulka 3.

	< 18 let	18 – 39 let	40 – 60 let	> 61 let
MAD	3,26 let	4,99 let	6,49 let	6,27 let
správné predikce	83,3%	83,3%	58,3%	76,5%

Tabulka 3: Shrnutí MAD u věkových kategorií ze studie Correia Dias *et al.*, 2020. Uvedena jsou také procenta správných predikcí v jednotlivých věkových skupinách.

Autoři dále testovali multilokusový APM na 51 krevních vzorcích zesnulých osob. Byly pozorovány rozdíly v úrovni methylace žijících a zesnulých osob u stejných CpG ostrůvků. U zesnulých osob došlo také ke snížení přesnosti modelu. MAD se zvýšila na 9,72 oproti 5,35 u žijících jedinců. Což je vysvětlitelné tím, že *post mortem* methylace degraduje. Tudíž tento model získaný na žijících osobách nelze použít na osoby zesulé.

Ve studii Correia Dias *et al.*, 2021 byly markery zkoumány napříč různými tkáněmi, které zahrnovaly krev, kosti a zuby. Zkoumanými markery byly *ELOVL2*, *FHL2*, *EDARADD*, *PDE4C* a *C1orf132* (MIR29B2 and MIR29C host gene). Methylace *C1orf132* vykazuje negativní korelaci s věkem, ostatní zkoumané v této studii pozitivní. Vzorky pocházely od 185 Portugalců, 76 žen a 109 mužů ve věku 1 – 94 let. Nejsilnější korelace mezi methylací a věkem byla nalezena u CpG6 *ELOVL2*. Pro APM bylo vybráno 8 CpG ostrůvků ze zkoumaných markerů: *EDARADD* (CpG3), *FHL2* (CpG1), *FHL2* (CpG5), *FHL2* (CpG11), *ELOVL2* (CpG5), *PDE4C* (CpG5), *PDE4C* (CpG9) a *C1orf132* (CpG3). MAD činila 5,96 let. Korelace mezi predikovaným a chronologickým věkem byla 0,92. Biologický věk lze vypočítat podle rovnice

$$\text{věk} = 20,746 - 24,290 \times EDARADD (\text{CpG3}) - 67,365 \times PDE4C (\text{CpG9}) + 62,311 \times ELOVL2 (\text{CpG5}) - 59,739 \times FHL2 (\text{CpG11}) - 26,162 \times C1orf132 (\text{CpG3}) + 48,920 \times PDE4C (\text{CpG5}) + 139,351 \times FHL2 (\text{CpG5}) - 67,055 \times FHL2 (\text{CpG1}). \quad (10)$$

Tabulka 4 shrnuje výše uvedené studie predikující biologický věk jedince podle methylace DNA. V tabulce jsou studie barevně rozděleny. Zeleně jsou zvýrazněny ty, u kterých vyšla nižší SE či MAD a jsou tedy přesnější. Červeně jsou znázorněny studie, u kterých vyšla SE či MAD o něco vyšší. Neznamená to ale, že by byly nepodstatné. Určitě se dále vyplatí zkoumat kombinace různých markerů, které mohou zpřesňovat tyto modely, viz Bocklandt *et al.*, 2011, kde po přidání *ELN* dojde ke snížení MAD z 5,2 na 3,5. Šedě označenou studii nelze zařadit, jelikož chybí údaj jak pro SE, tak pro MAD.

Jako přesnější se jeví studie Bocklandt *et al.*, 2011, Horvath, 2013; Yi *et al.*, 2015 a Park *et al.*, 2016. Z těchto nejlépe vychází Park *et al.*, 2016., kde byly použity geny *ELOVL2*, *ZNF423* a *CCDC102B*. MAD byla vypočítána na 3,156, což je oproti ostatním uvedeným studiím skutečně dobrý výsledek.

studie	markery	tkáň	korelační koeficient (r)	SE	MAD	rovnice pro výpočet biologického věku
Bocklandt <i>et al.</i> , 2011	<i>EDARADD</i> , <i>NPTX2</i> , <i>Tom1L1</i> , <i>ELN</i>	sliny	0,96, 0,92, 0,90	-	5,2; 3,5 (po přidání ELN)	-
Garagnani <i>et al.</i> , 2012	<i>ELOVL2</i> , <i>FHL2</i> , <i>PENK</i>	krev	0,92 pro <i>ELOVL2</i>	-	-	-
Horvath, 2013	353 CpG	mnoho (viz str. 23)	0,96	-	3,6*	-
Zbieć-Piekarska <i>et al.</i> , 2015	<i>ELOVL2</i>	krev	0,93	6,85	5,03	-
Yi <i>et al.</i> , 2015	<i>USP11</i> , <i>NOPI4</i> , <i>ZIC5</i>	krev	0,96 celkově	-	4	$\text{věk} = 103,007 - 49,205 \times M_{P1} - 71,875 \times M_{P2} + 67,645 \times M_{P3}$

Park <i>et al.</i> , 2016	<i>ELOVL2</i> , <i>ZNF423</i> , <i>CCDC102B</i>	krev	0,9352, -0,7769, -0,9061	6,32	3,156	věk = 39,73167 + ZNF423 (CpG_01) × -0.28914 + ELOVL2 (CpG_01) × 1,19242 + CCDC102B (CpG_01) × -0,69994
Correia Dias <i>et al.</i> , 2020	<i>ELOVL2</i> , <i>FHL2</i> , <i>EDARADD</i> , <i>PDE4C</i>	krev	0,972 celkově	-	5,35	**
Correia Dias <i>et al.</i> , 2021	<i>ELOVL2</i> , <i>FHL2</i> , <i>EDARADD</i> , <i>PDE4C</i> , <i>C1orf132</i>	krev, kosti, zuby	0,92 celkově	-	5,96	věk = 20,746 – 24,290 × <i>EDARADD</i> (CpG3) – 67,365 × <i>PDE4C</i> (CpG9) + 62,311 × <i>ELOVL2</i> (CpG5) – 59,739 × <i>FHL2</i> (CpG11) – 26,162 × <i>C1orf132</i> (CpG3) + 48,920 × <i>PDE4C</i> (CpG5) + 139,351 × <i>FHL2</i> (CpG5) – 67,055 × <i>FHL2</i> (CpG1)

Tabulka 4: Přehled studií Bocklandt *et al.*, 2011; Garagnani *et al.*, 2012; Horvath, 2013; Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015; Yi *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2016; Correia Dias *et al.*, 2020; Correia Dias *et al.*, 2021. U každé studie jsou uvedeny zkoumané markery, jejich korelační koeficient s biologickým věkem, tkáň, na kterých byl daný model pro predikci biologického věku vyzkoumán, jeho SE, MAD a rovnice pro výpočet biologického věku; - studie daný údaj neuvádí; \* studie uvádí median absolute difference; \*\* rovnice je uvedena pouze jako  $y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n$ ; zeleně jsou zvýrazněny studie, u kterých byla nižší SE či MAD a jejich modely jsou tedy přesnější; červeně jsou zvýrazněny méně přesné modely s vyšší SE či MAD; šedě označenou studii (Garagnani *et al.*, 2012) nelze zařadit, jelikož chybí údaj jak pro SE, tak pro MAD.

## 6. Závěr

Výše bylo popsáno několik metod, jak lze určit biologický věk jedince na základě analýzy DNA. V minulosti byla zkoumána racemizace kyseliny asparagové, konečné produkty pokročilé glykace (AGEs), mitochondriální delece a délka telomer. Od těchto metod se již upouští kvůli jejich nevýhodám a limitacím, mezi které patří také snazší degradace v biologických vzorcích. V současnosti se jako nejvíce nadějná jeví predikce biologického věku pomocí methylace. Methylace je stabilní a ve vzorcích se lépe zachovává. Byly nalezeny markery, které korelují s biologickým věkem pozitivně či negativně. Z markerů bylo sestaveno mnoho modelů s různou přesností.

I methylace má ale svá úskalí. Bývá tkáňově specifická, a tak většinou nelze aplikovat jeden model na široké spektrum tkání. Je třeba nadále zkoumat nové markery s cílem sestavit co nejpřesnější model, který umožní co nejpřesnější predikci biologického věku. Dosavadní modely mohou být doplněny o další markery, které je budou zpřesňovat. Je také nutné ověřit modely na různých typech tkání a u různých etnik. Při predikci biologického věku je třeba mít na paměti, že může být ovlivněn faktory, jako je životní styl a onemocnění. Při některých onemocněních dochází k deregulaci methylace, a tak bude biologický věk těchto osob zkreslen.

Čím užší bude rozmezí predikovaného věku, tím bude daný model pro forenzní vyšetřování užitečnější. Cílem v budoucnu by tedy mělo být nalezení co nejpřesnějšího modelu sestaveného z markerů, které nejvíce korelují s věkem. Model by zároveň mělo být možné použít na různé tkáně. Tím, že je ale methylace tkáňově specifická, je pravděpodobně nereálné najít jeden univerzální model. Místo toho bychom mohli definovat pár (například tři) modely a k nim definovat, v jakých tkáních fungují spolehlivě, standardizovat je a plošně využívat.

## 7. Seznam použité literatury

Active Motif's Bisulfite Conversion Kit Manual [online]. [cit. 2022-4-22]. PDF document. Dostupné z <https://www.activemotif.com/documents/1899.pdf>.

Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., *et al.*, 1992. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 10114-10118.

Amano, H., Chaudhury, A., Rodriguez-Aguayo, C., Lu, L., Akhanov, V., Catic, A., Popov, Y.V., Verdin, E., Johnson, H., Stossi, F., Sinclair, D.A., Nakamaru-Ogiso, E., Lopez-Berestein, G., Chang, J.T., Neilson, J.R., Meeker, A., Finegold, M., Baur, J.A., Sahin, E., 2019. Telomere Dysfunction Induces Sirtuin Repression that Drives Telomere-Dependent Disease. *Cell Metabolism* 29, 1274–1290.e9.

Anderson, R. M., Bitterman, K. J., Wood, J. G., Medvedik, O., Sinclair, D. A., 2003. Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 423, 181–185.

Anton, S., Leeuwenburgh, C., 2013. Fasting or caloric restriction for Healthy Aging. *Experimental Gerontology* 48, 1003–1005.

Aspell, R., 2012. Yang Sheng Fa-The art of health preservation. *The Journal of The Association of Traditional Chinese Medicine And Acupuncture UK*.

Bartosz, G., 1996. Chapter 3 Erythrocyte Aging, in: *Advances in Cell Aging and Gerontology*. *Advances in Cell Aging and Gerontology*, pp. 63–88.

Bednařík, T., 2006. Čachtická paní: ďábel s tváří anděla. XYZ.

Beetsch, J.W., Park, T.S., Dugan, L.L., Shah, A.R., Gidday, J.M., 1998. Xanthine oxidase-derived superoxide causes reoxygenation injury of ischemic cerebral endothelial cells. *Brain Research* 786, 89–95.

Bilaud, T., Brun, C., Ancelin, K. *et al.*, 1997. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet* 17, 236–239.

Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, M.E., Sánchez, F.J., Sinsheimer, J.S., Horvath, S., Vilain, E., 2011. Epigenetic Predictor of Age. *PLOS ONE* 6, e14821.

Broccoli, D., 2004. Function, replication and structure of the mammalian telomere. *Cytotechnology* 45, 3–12.

- Caron, A., Labbé, S. M., Carter, S., Roy, M. C., Lecomte, R., Ricquier, D., Picard, F., Richard, D., 2017. Loss of UCP2 impairs cold-induced non-shivering thermogenesis by promoting a shift toward glucose utilization in brown adipose tissue. *Biochimie*, 134, 118–126.
- Cawthon, R.M., 2002. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Research* 30, 47e–47.
- Collins, F. S., Morgan, M., Patrinos, A., 2003. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science* 300, 286–290.
- Cornu, M., Albert, V., Hall, M.N., 2013. mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* 23, 53–62.
- Corral-Debrinski, M., Stepien, G., Shoffner, J. M., Lott, M. T., Kanter, K., & Wallace, D. C., 1991. Hypoxemia is associated with mitochondrial DNA damage and gene induction: implications for cardiac disease. *Jama*, 266, 1812-1816.
- Correia Dias, H., Cunha, E., Corte Real, F., Manco, L., 2020. Age prediction in living: Forensic epigenetic age estimation based on blood samples. *Legal Medicine* 47, 101763.
- Correia Dias, H., Manco, L., Corte Real, F., Cunha, E., 2021. A Blood–Bone–Tooth Model for Age Prediction in Forensic Contexts. *Biology* 10, 1312.
- Counter, C.M., Ailion, A.A., Lefevre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B., Bacchetti, S., 1992. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity.. *The EMBO Journal* 11, 1921–1929.
- Dahl, C., Grønbaek, K., Guldborg, P., 2011. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. *Clinica Chimica Acta* 412, 831–836.
- Daneels, L., Martens, D.S., Arredouani, S., Billen, J., Koppen, G., Devlieger, R., Nawrot, T.S., Ghosh, M., Godderis, L., Pauwels, S., 2021. Maternal Vitamin D and Newborn Telomere Length. *Nutrients* 13, 2012.
- Das, B., Saini, D., Seshadri, M., 2009. Telomere Length in Human Adults and High Level Natural Background Radiation. *PLOS ONE* 4, e8440.
- De Lange, T., 2004. T-loops and the origin of telomeres. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 323–329.
- Demongeot, J., 2009. Biological boundaries and biological age. *Acta Biotheoretica*, 57, 397-418.

- Di Daniele, N., Noce, A., Vidiri, M.F., Moriconi, E., Marrone, G., Annicchiarico-Petruzzelli, M., D'Urso, G., Tesauro, M., Rovella, V., De Lorenzo, A., 2017. Impact of Mediterranean diet on metabolic syndrome, cancer and longevity. *Oncotarget* 8, 8947–8979.
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M.A., Huang, L.-H., Midgett, R.M., Kuo, K.C., Mccune, R.A., Gehrke, C., 1982. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Research* 10, 2709–2721.
- Ferec A., 2018. *Genetika pro trenéry: Dekódování sportovního genu*. Grada Publishing.
- Flores, I., Cayuela, M. L., Blasco, M. A., 2005. Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science* 309, 1253–1256.
- Forsyth, N.R., Wright, W.E., Shay, J.W., 2002. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: Turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* 69, 188–197.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 1827–1831.
- Garagnani, P., Bacalini, M.G., Pirazzini, C., Gori, D., Giuliani, C., Mari, D., Di Blasio, A.M., Gentilini, D., Vitale, G., Collino, S., Rezzi, S., Castellani, G., Capri, M., Salvioli, S., Franceschi, C., 2012. Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age. *Aging Cell* 11, 1132–1134.
- Ge, Y., Zhou, M., Chen, C., Wu, X., Wang, X., 2022. Role of AMPK mediated pathways in autophagy and aging. *Biochimie* 195, 100–113.
- Goel, N., Karir, P., Garg, V.K., 2017. Role of DNA methylation in human age prediction. *Mechanisms of Ageing and Development* 166, 33–41.
- Griffin, R. C., Moody, H., Penkman, K. E., Fagan, M. J., Curtis, N., Collins, M. J., 2008. A new approach to amino acid racemization in enamel: testing of a less destructive sampling methodology. *Journal of forensic sciences*, 53, 910-916.
- Guarente, L., 2007. Sirtuins in Aging and Disease. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 72, 483–488.
- Harman, D., 1956. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology* 11, 298–300.
- Hayflick, L., 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 37, 614–636.

- Heather, J.M., Chain, B., 2016. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* 107, 1–8.
- Helfman, P., Bada, J. L., 1976. Aspartic acid racemisation in dentine as a measure of ageing. *Nature*, 262, 279-281.
- Hewakapuge, S., Van Oorschot, R.A.H., Lewandowski, P., Baidur-Hudson, S., 2008. Investigation of telomere lengths measurement by quantitative real-time PCR to predict age. *Legal Medicine* 10, 236–242.
- HGNC: HUGO Gene Nomenclature Committee [online]. © 2021 [cit. 2022-3-24]. Dostupné z <https://www.genenames.org/>.
- Horvath, S., 2013. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology* 14, R115.
- Hrycay, E.G., Bandiera, S.M., 2015. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer, in: *Advances in Pharmacology*. *Advances in Pharmacology*, pp. 35–84.
- Iyama, T., Wilson, D.M., 2013. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair* 12, 620–636.
- Jackson, M.D., Denu, J.M., 2002. Structural Identification of 2'- and 3'-O-Acetyl-ADP-ribose as Novel Metabolites Derived from the Sir2 Family of  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>-dependent Histone/Protein Deacetylases. *Journal of Biological Chemistry* 277, 18535–18544.
- Jacobs, H.T., 2003. The mitochondrial theory of aging: dead or alive?. *Aging Cell* 2, 11–17.
- Kar, A., Jones, N., Arat, N.Ö., Fishel, R., Griffith, J.D., 2018. Long repeating (TTAGGG) single-stranded DNA self-condenses into compact beaded filaments stabilized by G-quadruplex formation. *Journal of Biological Chemistry* 293, 9473–9485.
- Karlsson, A.O., Svensson, A., Marklund, A., Holmlund, G., 2008. Estimating human age in forensic samples by analysis of telomere repeats. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1, 569–571.
- Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., Shay, J. W., 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011–2015.
- Klutstein, M., Nejman, D., Greenfield, R., Cedar, H., 2016. DNA Methylation in Cancer and Aging. *Cancer Research* 76, 3446–3450.

- Kristensen, L.S., Hansen, L.L., 2009. PCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment. *Clinical Chemistry* 55, 1471–1483.
- Kulkarni, S.S., Cantó, C., 2015. The molecular targets of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1852, 1114–1123.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., *et al.*, 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.
- Lengyelová, T., Várkonyi, G., 2009. *Báthory: život a smrt*. Ottovo nakladatelství.
- Leonard, A.E., Kelder, B., Bobik, E.G., Chuang, L.-T., Lewis, C.J., Kopchick, J.J., Mukerji, P., Huang, Y.-S., 2002. Identification and expression of mammalian long-chain PUFA elongation enzymes. *Lipids* 37, 733–740.
- Li, W., 2011. On parameters of the human genome. *Journal of Theoretical Biology* 288, 92–104.
- Li, X., Kazgan, N., 2011. Mammalian Sirtuins and Energy Metabolism. *International Journal of Biological Sciences* 7, 575–587.
- Li, Y., Tollefsbol, T.O., 2011. DNA Methylation Detection: Bisulfite Genomic Sequencing Analysis, in: *Methods in Molecular Biology*. *Methods in Molecular Biology*, pp. 11–21.
- Lin, S. J., Ford, E., Haigis, M., Liszt, G., Guarente, L., 2004. Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes & development*, 18, 12–16.
- Liu, B., Bau, Y. S., 1980. *Fungi pharmacopoeia (sinica)*.
- Longhese, M.P., 2012. The role of shelterin in maintaining telomere integrity. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 17, 1715.
- Maguolo, A., Zusi, C., Giontella, A., Miraglia Del Giudice, E., Tagetti, A., Fava, C., Maffei, C., 2021. Influence of genetic variants in FADS2 and ELOVL2 genes on BMI and PUFAs homeostasis in children and adolescents with obesity. *International Journal of Obesity*, 45(1), 56-65.
- Martens, U. M., Zijlmans, J. M. J. M., Poon, S. S., Dragowska, W., Yui, J., Chavez, E. A., Lansdorp, P. M., 1998. Short telomeres on human chromosome 17p. *Nature genetics*, 18, 76-80.
- Maxam, A.M., Gilbert, W., 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 560–564.
- Márquez-Ruiz, A. B., González-Herrera, L., & Valenzuela, A., 2018. Usefulness of telomere length in DNA from human teeth for age estimation. *International Journal of Legal Medicine*, 132, 353-359.

- Meissner, C., Ritz-Timme, S., 2010. Molecular pathology and age estimation. *Forensic Science International* 203, 34–43.
- Moore, L.D., Le, T., Fan, G., 2013. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology* 38, 23–38.
- Moraes, F., Góes, A., 2016. A decade of human genome project conclusion: Scientific diffusion about our genome knowledge. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 44, 215–223.
- Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L., Wu, J.R., 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 6622–6626.
- Nahata, A., 2013. *Ganoderma lucidum*: A Potent Medicinal Mushroom with Numerous Health Benefits. *Pharmaceutica Analytica Acta* 4.
- Nass, N., Bartling, B., Navarrete Santos, A., Scheubel, R.J., Börgermann, J., Silber, R.E., Simm, A., 2007. Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie* 40, 349–356.
- National Library of Medicine: *National Center for Biotechnology Information* [online]. [cit. 2022-4-16]. Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>.
- Nowak, R., 1995. Venter Wins Sequencing Race – Twice. *Science* 268, 1273.
- Nurk, S., Koren, S., Rhie, A., Rautiainen, M., Bzikadze, A. V., *et al.*, 2022. The complete sequence of a human genome. *Science*, 376, 44-53.
- Ohtani, S., 1995. Estimation of age from dentin by using the racemization reaction of aspartic acid. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 16, 158-161.
- Olmos, Y., Brosens, J.J., Lam, E.W.-F., 2011. Interplay between SIRT proteins and tumour suppressor transcription factors in chemotherapeutic resistance of cancer. *Drug Resistance Updates* 14, 35–44.
- Olovnikov, A.M., 1973. A theory of marginotomy. *Journal of Theoretical Biology* 41, 181–190.
- Park, J. K., Ryu, J. K., Lee, K. H., Lee, J. K., Yoon, W. J., Lee, S. H., *et al.*, 2007. Quantitative analysis of NPTX2 hypermethylation is a promising molecular diagnostic marker for pancreatic cancer. *Pancreas*, 35, 9-15.
- 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 Science International: Genetics* 23, 64–70.

- Pelmenschikov, V., Siegbahn, P.E.M., 2005. Copper–Zinc Superoxide Dismutase: Theoretical Insights into the Catalytic Mechanism. *Inorganic Chemistry* 44, 3311–3320.
- Perteua, M., Salzberg, S.L., 2010. Between a chicken and a grape: estimating the number of human genes. *Genome Biology* 11, 206.
- Pilin, A., Pudil, F., Bencko, V., 2007. Changes in colour of different human tissues as a marker of age. *International Journal of Legal Medicine* 121, 158–162.
- Piper, M.D.W., Bartke, A., 2008. Diet and Aging. *Cell Metabolism* 8, 99–104.
- Raymond, J.J., Van Oorschot, R.A.H., Gunn, P.R., Walsh, S.J., Roux, C., 2009. Trace evidence characteristics of DNA: A preliminary investigation of the persistence of DNA at crime scenes. *Forensic Science International: Genetics* 4, 26–33.
- Ritz-Timme, S., Laumeier, I., Collins, M., 2003. Age estimation based on aspartic acid racemization in elastin from the yellow ligaments. *International Journal of Legal Medicine* 117, 96–101.
- Rubio, L., Martinez, L. J., Martinez, E., De Las Heras, S. M., 2009. Study of short-and long-term storage of teeth and its influence on DNA. *Journal of forensic sciences* 54, 1411-1413.
- Rusk, N., 2009. Cheap third-generation sequencing. *Nature Methods* 6, 244–244.
- Saini, A., Mastana, S., Myers, F., Lewis, M., 2013. ‘From Death, Lead Me to Immortality’ – Mantra of Ageing Skeletal Muscle. *Current Genomics* 14, 256–267.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 5463–5467.
- Santiago, M., Antunes, C., Guedes, M., Sousa, N., Marques, C.J., 2014. TET enzymes and DNA hydroxymethylation in neural development and function — How critical are they?. *Genomics* 104, 334–340.
- Samassekou, O., Gadji, M., Drouin, R., Yan, J., 2010. Sizing the ends: normal length of human telomeres. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft*, 192, 284-91 .
- Sebastiani, P., Federico, A., Morris, M., Gurinovich, A., Tanaka, T., Chandler, K.B., Andersen, S.L., Denis, G., Costello, C.E., Ferrucci, L., Jennings, L., Glass, D.J., Monti, S., Perls, T.T., 2021. Protein signatures of centenarians and their offspring suggest centenarians age slower than other humans. *Aging Cell* 20.
- Shampo, M.A., Kyle, R.A., 2011. J. Craig Venter—The Human Genome Project. *Mayo Clinic Proceedings* 86, e26–e27.

- Shendure, J., Ji, H., 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, 26, 1135-1145.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., Simon, M., 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 8794–8797.
- Shoffner, J. M., Lott, M. T., Voljavec, A. S., Soueidan, S. A., Costigan, D. A., & Wallace, D. C., 1989. Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 7952-7956.
- Sinclair, D.A., LaPlante, M.D., 2020. *Konec stárnutí – Proč stárneme a proč už nemusíme*. Jan Melvil Publishing.
- Srivastava, S., 2019. Emerging Insights into the Metabolic Alterations in Aging Using Metabolomics. *Metabolites* 9, 301.
- Starr, J.M., Shiels, P.G., Harris, S.E., Pattie, A., Pearce, M.S., Relton, C.L., Deary, I.J., 2008. Oxidative stress, telomere length and biomarkers of physical aging in a cohort aged 79 years from the 1932 Scottish Mental Survey. *Mechanisms of Ageing and Development* 129, 745–751.
- Sun, C., Zou, M., Wang, X., Xia, W., Ma, Y., Liang, S., Hao, Y., Wu, L., Fu, S., 2018. FADS1-FADS2 and ELOVL2 gene polymorphisms in susceptibility to autism spectrum disorders in Chinese children. *BMC Psychiatry* 18.
- Takasaki, T., Tsuji, A., Ikeda, N., Ohishi, M., 2003. Age estimation in dental pulp DNA based on human telomere shortening. *International Journal of Legal Medicine* 117, 232–234.
- TCM World, 2022. [cit. 2022-3-20]. Dostupné z <https://www.tcmworld.org/>.
- Tsuji, A., Ishiko, A., Takasaki, T., Ikeda, N., 2002. Estimating age of humans based on telomere shortening. *Forensic Science International* 126, 197–199.
- Van Steensel, B., Smogorzewska, A., De Lange, T., 1998. TRF2 Protects Human Telomeres from End-to-End Fusions. *Cell* 92, 401–413.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., *et al.*, 2001. The Sequence of the Human Genome. *Science* 291, 1304–1351.
- Watson, J. D., 1978. The Human Genome Project: Past, Present, and Future. In *Am. J. Obstet. Gynecol* 13. Academic Press.

- Wu, T.P., Wang, T., Seetin, M.G., Lai, Y., Zhu, S., Lin, K., Liu, Y., Byrum, S.D., Mackintosh, S.G., Zhong, M., Tackett, A., Wang, G., Hon, L.S., Fang, G., Swenberg, J.A., Xiao, A.Z., 2016. DNA methylation on N6-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature* 532, 329–333.
- Yi, S.H., Jia, Y.S., Mei, K., Yang, R.Z., Huang, D.X., 2015. Age-related DNA methylation changes for forensic age-prediction. *International Journal of Legal Medicine* 129, 237–244.
- Zbieć-Piekarska, R., Spólnicka, M., Kupiec, T., Makowska, Z., Spas, A., Parys-Proszek, A., Kucharczyk, K., Płoski, R., Branicki, W., 2015. Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. *Forensic Science International: Genetics*, 14, 161–167.
- Zeviani, M., Moraes, C. T., DiMauro, S., Nakase, H., Bonilla, E., Schon, E. A., & Rowland, L. P., 1988. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology*, 38, 1339-1339.
- Zhanwen L., Lieguang M., 2007. *Health Preservation in Traditional Chinese Medicine*. People's Medical Publishing House.
- Zvereva, M.I., Shcherbakova, D.M., Dontsova, O.A., 2010. Telomerase: Structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry* 75, 1563–1583.
- 3dgenome, 2019 [online]. [cit. 2022-3-10]. Dostupné z <https://zhonglab.gitbook.io/3dgenome/chap0-preparation/0.2-sequencing-technologies>.