

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: B-MOBIBO



Kristína Letková

Nové možnosti rozlišení monozygotních dvojčat

New possibilities to distinguish monozygotic twins

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Iva Kulichová, Ph.D.

Praha, 2024

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, 29.4. 2024

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce, Mgr. Ivě Kulichové, Ph.D., za odborné vedení, trpělivost, ochotu a cenné rady, které mi v průběhu celého zpracování bakalářské práce věnovala a které mi pomohly tuto práci zkompletovat.

Abstrakt

Nutnost rozeznání monozygotních dvojčat z genetického hlediska je důležité nejen pro určování paternity, kdy se rozhoduje, který ze dvou jednovaječných dvojčat je otcem, ale také například pro kriminální případy, v nichž je nutné identifikovat pachatele, jímž je jedno z monozygotních dvojčat. Mimo rozbor a zhodnocení molekulárně biologických metod se práce zabývá i samotnými monozygotními dvojčaty, jejich vznikem a příčinami vzniku. Téma zasahuje jak do oblasti forenzní genetiky, tak i do oblasti medicínální.

Klíčová slova

Monozygotní dvojčata, embryogeneze, forenzní genetiky, microDNA, mtDNA, SNPs, XCI, metylace DNA

Abstract

The necessity of distinguishing monozygotic twins from a genetic point of view is important not only for determining paternity, when it is decided which of two identical twins is the father, but also, for example, for criminal cases, where it is necessary to identify the perpetrator who is one of the monozygotic twins. In addition to analyzing and evaluating molecular biological methods, the work also deals with monozygotic twins themselves, their emergence and the causes of their emergence. The topic affects both forensic genetics and medical fields.

Key words

Monozygotic twins, embryogenesis, forensic genetics, microDNA, mtDNA, SNPs, XCI, DNA methylation

Seznam zkratek

AMK	aminokyselina
ART	techniky asistované reprodukce (z angl. <i>assisted reproductive technology</i>)
BCR	B-buněčný receptor (z angl. <i>B-cell receptor</i>)
CDR3	z angl. <i>complementarity determining region 3</i>
CNV	variabilita počtu kopií (z angl. <i>copy number variation</i>)
DC	dichorionická
DZ	dizygotní
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FMZT	familiární monozygotický vznik dvojčat (z angl. <i>familial MZ twinning</i>)
HVS 1,2	hypervariabilní segment 1,2
IGH	těžký řetězec imunoglobulinu
MC	monochorionická
miRNA	microRNA
MPS	masivně paralelní sekvenování
mtDNA	mitochondriální DNA
MZ	monozygotní
PAR	pseudo-autozomální region
PGCs	primordiální zárodečné buňky (z angl. <i>primordial germ cells</i>)
PHP	bodová heteroplasmie (z angl. <i>point heteroplasmy</i>)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní forma kyslíku (z angl. <i>reactive oxygen species</i>)
RT-PCR	z angl. <i>real-time polymerase chain reaction</i>
SAM	S-adenosylmethionin
SNPs	jedno-nukleotidové polymorfismy (z angl. <i>single-nucleotide polymorphism</i>)
STRs	krátké tandemové repetice (z angl. <i>short tandem repeats</i>)
SNV	jednonukleotidová variace (z angl. <i>single nucleotide variant</i>)
TCR β	T-buněčný receptor β (z angl. <i>T-cell receptor β</i>)
tDMSs	CpG místa s rozdílnou metylací u dvojčat (z angl. <i>twin differentially methylated CpG sites</i>)
UV	ultrafialové (z angl. <i>ultraviolet</i>)
XCI	inaktivace X chromozomu

Obsah

1. ÚVOD	1
2. MONOZYGOTNÍ DVOJČATA	2
2.1 EMBRYOGENEZE	2
2.2 ETIOLOGIE MONOZYGOZITY	5
3. ROZDÍLY U MONOZYGOTNÍCH DVOJČAT A METODY JEJICH DETEKCE	6
3.1 BODOVÉ MUTACE.....	6
3.2 VARIABILITA POČTU KOPÍÍ ÚSEKŮ DNA	7
3.3 MITOCHONDRIÁLNÍ DNA	8
3.4 INAKTIVACE X CHROMOZOMU	10
3.5 METYLACE DNA	11
3.6 MIKRORNA	13
3.7 IMUNOLOGICKÉ ZNAKY	15
4. VYUŽITÍ MARKERŮ PRO FOREZNÍ IDENTIFIKACI Z BIOLOGICKÉHO VZORKU	17
5. ZÁVĚR	22
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	23

1. Úvod

Forenzní genetika se podílí na řešení kriminalistických případů prostřednictvím analýzy DNA z biologických stop. Cílem je individuální identifikace jednotlivce, jehož biologický materiál byl nalezen na místě činu. Pro stanovení profilu DNA se standardně používá fragmentační analýza 16–24 krátkých tandemových repetitivních sekvencí – STRs (z angl. short tandem repeats), které jsou vysoce polymorfní a jejich kombinace je tudíž pro každého jedince specifická (Butler, 2007). Tento proces umožňuje porovnání profilů DNA ze vzorků zajištěných na místě činu s profily DNA v databázi profilů DNA podezřelých a obviněných a poskytuje klíčové důkazy pro objasnění kriminalistických případů. V moderní forenzní genetice se ovšem setkáváme s výzvou v podobě rozlišení jednovaječných neboli monozygotních (MZ) dvojčat. MZ dvojčata sdílí téměř identickou genetickou informaci a analýzou STRs je nelze rozlišit. To může být problematické například v případech, kdy je jedno z dvojčat pachatelem trestného činu, nebo v případech paternity, kdy je potřeba zjistit, které z dvojčat je biologickým otcem dítěte. Proto se s přibývajícím počtem případů, kde je rozlišení mezi MZ dvojčaty nezbytné, stává naléhavým úkolem nalézt nové, sofistikovanější metody, které by umožnily spolehlivější a přesnější identifikaci.

Cílem mé bakalářské práce je vytvoření ucelené literární rešerše, která se zabývá zhodnocením nových možností a metod molekulární biologie pro rozpoznání MZ dvojčat ve forenzním kontextu. Na začátku se věnuji samotným MZ dvojčatům, aby došlo ke komplexnímu vysvětlení problematiky a propojení souvislostí. Zmiňuji se o tom, jak a kdy vznikají a co jejich vznik zapříčinilo. Poté se zaměřím na možné druhy analýzy biologického vzorku za účelem rozlišení MZ dvojčat. Ty lze rozlišit pomocí DNA, která je využita zejména v analýze jednonukleotidových polymorfismů (SNP, z angl. single-nucleotide polymorphism), variability počtu kopií úseků DNA (CNV, z angl. copy number variation) a mitochondriální DNA (mtDNA). U žen se vyskytuje také inaktivace X chromozomu (XCI). Dále lze využít epigenetické markery – tj. metylaci DNA, transkriptom – microRNA, a v neposlední řadě existuje možnost rozlišení podle imunitního systému. Každá metoda nemusí být vhodná pro všechny případy, proto také vyhodnotím využití jednotlivých metod pro účely forenzní identifikace.

2. Monozygotní dvojčata

V převážné většině jsou mnohočetná těhotenství dvojčetná, což znamená, že se narodí dvojčata. Z tohoto důvodu se i tato bakalářská práce věnuje pouze případům dvojčat, i když informace zde uvedené, jsou použitelné i pro vícčetata. Dvojčata, která vznikla ze dvou zygot, bývají označována jako dizygotní (DZ) a stejně jako sourozenci, sdílí v průměru polovinu genetické informace. Naopak MZ dvojčata vznikají z jedné zygoty, a proto se dlouho předpokládalo, že tato dvojčata jsou geneticky úplně identická. MZ dvojčata jsou jednou z nejčastějších hlavních vrozených abnormalit, kdy celosvětová celková incidence je konstantní a v průměru ve čtyřech z 1000 porodů se narodí MZ dvojčata (Bortolus et al., 1999).

2.1 Embryogeneze

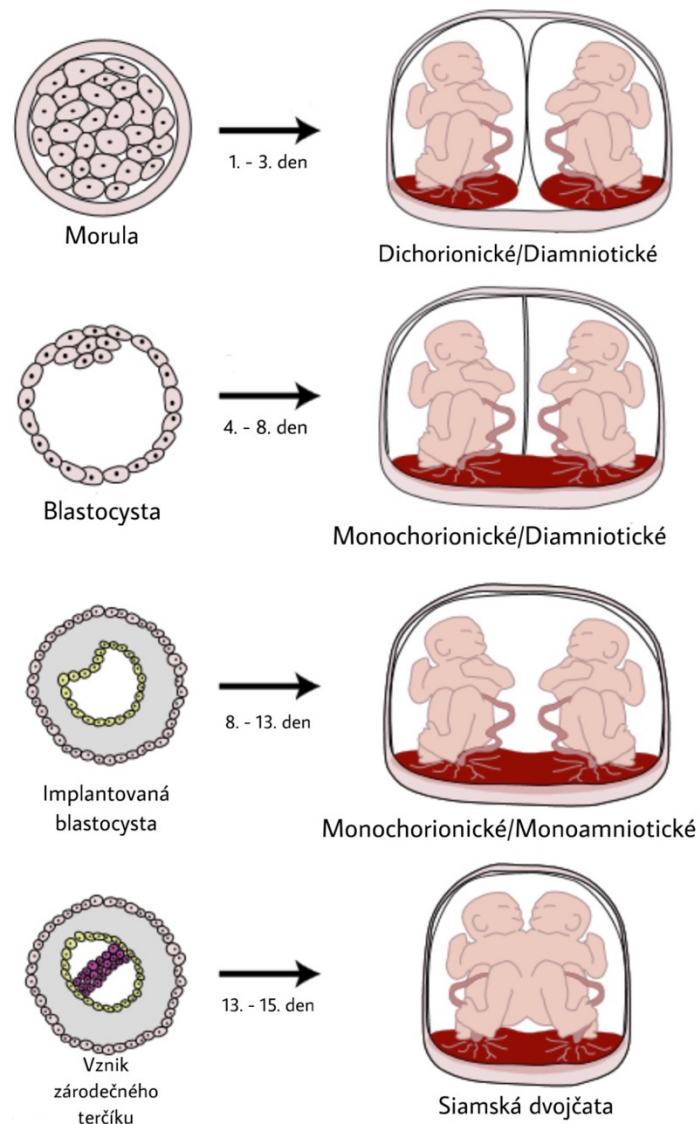
Embryogeneze MZ dvojčat představuje komplexní proces, který začíná po oplodnění vajíčka jednou spermií a pokračuje prostřednictvím několika klíčových událostí v raném embryonálním vývoji, jsou tedy výsledkem procesu zvaném rýhování (angl. cleavage) moruly v raném embryonálním vývoji (Gilbert, 2000).

Po rozdělení zygoty se během dalšího vývoje těchto embryí každé z nich vyvíjí samostatně, přičemž každé má vlastní placentu a amniotický vak. Některá dvojčata ovšem mohou mít i sdílenou placentu nebo amniotický vak. Na základě sdílených membrán se rozdělují dvojčata na dichorionické diamniotické, kdy má každé z nich vlastní obaly, dále na monochorionické diamniotické, kdy sdílejí pouze placentu, ale amniotický vak má každé dvojče svůj a posledním typem je monochorionický monoamniotický, kdy dvojčata sdílejí oba dva obaly a tento typ bývá nejrizikovějším těhotenství z výše jmenovaných typů (Mackie et al., 2016).

Z celkového počtu případů MZ dvojčat dojde u jedné třetiny (27,9 %) k dělení moruly do čtvrtého dne po oplodnění, kdy je morula tvořena 16–32 buňkami a MZ dvojčata jsou tedy dichorionická (DC). Zbýlé dvě třetiny (72,1 %) MZ dvojčat, která jsou již monochorionická (MC), prochází procesem rýhování mezi 4.–8. dnem po oplodnění a morula je v tomto období tvořena již 40–150 buňkami (Lee et al., 2010; Mackie et al., 2016). Ve výjimečných případech dojde k separaci po 8. dni po oplození, což s sebou přináší další jedinečnosti – dvojčata sdílejí amniotický vak (obr. 1). Naprostou výjimkou jsou tzv. siamská dvojčata, která bývají srostlá částmi svých těl, neboť k rýhování dochází až po 12. dni (Mackie et al., 2016). Rozdělení zygoty může být způsobeno buď náhodnými mechanickými či chemickými vlivy, které se odehrávají

v děloze, nebo svou roli mohou hrát různé genetické nebo epigenetické faktory (Matias et al., 2020).

Každá morula následně pokračuje v dělení a transformuje se v blastocystu, jež se skládá z vnější vrstvy zvané trofoblast a z vnitřní vrstvy embryoblastu. Blastocysta migruje a implantuje se do sliznice dělohy, kde se začíná rozvíjet embryonální disk, který se diferencuje do tří zárodečných vrstev – ektodermu, mezodermu a endodermu – a ty dávají vzniku specifickým tkáním a orgánům těla (Gilbert, 2000).



Obr. 1 – Chorionicita a amnionicita u dvojčat v závislosti na rozdělení zygoty (převzato od Dufendach, K. (Artist). (2008). Placentation. [Web] Wikipedia <https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3APlacentation.svg>, upraveno autorkou)

Aby bylo možné rozlišit MZ dvojčata na základě mutací v DNA, musí tyto mutace vzniknout v raném stádiu embryonálního vývoje, ale až po rozdělení moruly, eventuálně těsně

před rozdělením, a to v místech, která pak budou náležet pouze jednomu z dvojčat (Weber-Lehmann et al., 2014). Mutace, které jsou přítomné v zárodečné linii, jsou dědičné, ovšem mutace vznikající později v somatických liniích se už na potenciální potomky nepřenáší (Gilbert et al., 1996).

Během embryogeneze vstoupí zárodečné buňky do série komplexních událostí, které jsou zakončeny vytvořením vajíčka a spermií, bohužel zejména kvůli nepřístupnosti lidského embrya v raných stádiích vývoje je doposud málo znalostí o přesném vývoji lidských primordiálních zárodečných buněk (PGCs, z angl. primordial germ cells) (Weber-Lehmann et al., 2014). PGCs jsou brzy specifikovány v epiblastu a před začátkem gastrulace urychleně migrují do extra-embryonální oblasti, poté jsou PGCs opětovně určeny a znovu vstupují do embrya během raných stádií gastrulace, aby mohly dosáhnout vyvíjejících se pohlavních žláz (De Felici, 2013).

Proces gastrulace vytváří primární tkáňové rozdíly mezi třemi zárodečnými listy. Z endodermu se formují orgány a mezoderm dává vzniku svalům, částem cévního systému, včetně samotné krve, nebo reprodukčnímu systému, což zahrnuje i gamety. Z ektodermu vzniká např. epidermis. Jakmile dojde ke specializaci těchto tří primárních buněčných typů, mohou se začít vyvíjet do specializovaných tkání či orgánů (Wertheim, 2011).

Ve forenzní genetice se využívají zejména vzorky, jež jsou ektodermálního původu, tj. dotekové vzorky, vzorky bukalní sliznice či sperma. Případně se analyzují stopy mezodermálního původu, a to krev. Mutace, které se objevují u jednoho dvojčete jak v bukalní sliznici, tak i ve vzorcích spermatu, ale nikoliv v krvi, musely vzniknout po procesu gastrulace a také před rozdělením bukalní sliznice a spermatického prekursoru. Pokud se mutace vyskytuje ve všech třech typech zmíněných vzorků, pak k ní muselo dojít ještě před rozdělením zárodečných vrstev. Naopak mutace přítomna pouze ve spermiích je tou nejnovější (Weber-Lehmann et al., 2014).

Epigenetické změny jako např. metylace DNA vznikají ihned po oplodnění, kdy dojde k několika demetylacím DNA pre-implantačního embrya, a jsou následovány *de novo* metylací DNA (Zhu et al., 2018). Avšak průběh vzniku epigenetických změn je ovlivněn nejen různými technikami asistované reprodukce (ART) a manipulací s embryem, ale také vystavením embrya různým teplotám, pH, nebo změnám hormonálních hladin (Mani et al., 2020).

2.2 Etiologie monozygosity

Samotný původ monozygosity zkoumají vědci již mnoho dekad, přičemž jako dvě jediné příčiny, které se v průběhu let dokázaly potvrdit, jsou léčba infertility a dědičnost. Mimo dva zmíněné původy, které jsou již řadu let potvrzené, byla u mála případů nahlášena i řada dalších potenciálních etiologií (Blickstein, 2020).

Jako jedny z pravděpodobných příčin můžeme považovat kupříkladu ART, kterým věnovali studii Parazzini et al. (2016), jež zjistili, že frekvence narození MZ dvojčat po přirozeném početí je 1,24/100 a po asistované reprodukci se tato frekvence zvýší na 20,05/100 porodů. Bylo zjištěno, že ART s mikromanipulací, a následný transfer blastocyst jsou spojeny s mnohem vyšším počtem dělení zygot, než je tomu u ART bez mikromanipulace, která je sama o sobě spojena s velkým počtem dělení zygot (Blickstein, 2020; Saito et al., 1995). Avšak zvýšené dělení zygot je spjato spíše v případech s potřebou mikromanipulace, tj. opakované oplodnění a neúspěšné implantace, než se samotným procesem mikromanipulace (Blickstein, 2020).

Druhou zmíněnou možností je genetická příčina nazývaná FMZT – familiární MZ twinning (twinning je termín popisující vznik dvojčat), kdy se v rodinách objevuje zvýšený výskyt MZ dvojčat. FMZT však nebývá příliš časté, protože se frekvence narození MZ dvojčat do rodin, kde již jeden pár MZ dvojčat je, oproti frekvenci narození MZ v běžné populaci tolik neliší (Harvey et al., 1977). FMZT má autozomálně dominantní dědičnost se sníženou penetrancí (Hamamy et al., 2004) a chorionicita zůstává v jedné rodině neměnná, tzn. v dané rodině se vyskytovala buď pouze MC MZ dvojčata, anebo jen DC MZ dvojčata, a nevznikl žádný cross-over MC a DC v rámci rodiny (Machin, 2009). Z tohoto tedy vyplývá, že by mohly existovat dvě mutace jako predispozice pro FMZT – první se odehraje ta mutace, která způsobuje DC placentaci a po ní následuje druhá mutace způsobující MC placentaci (Machin, 2009). Během novější studie (Liu et al., 2018) byly za použití celogenomového sekvenování zkoumány genetické faktory u rodiny, v níž se ve čtyřech generacích objevuje celkem sedm párů MZ dvojčat ženského pohlaví. V příslušné studii byla u daných jedinců objevena relativně velká proporce genetických polymorfismů, které byly detekovány v genech spjatých s buněčným spojením, a to buď obsahovaly nové SNPs mající funkční efekt, nebo byly lokalizovány v CNVs specifických pro MZ dvojčata. Z daných genů vypadá slibně gen FGFR1 s novými SNPs, jehož některé mutace jsou spjaty s autozomálně dominantními syndromy. Avšak i přesto jsou všechny nalezené kandidátní geny zodpovědné pouze za zvýšení možné pravděpodobnosti narození MZ dvojčat (Liu et al., 2018).

3. Rozdíly u monozygotních dvojčat a metody jejich detekce

U DZ dvojčat bývají rozdíly ihned od pohledu patrné, neboť vznikly oplodněním dvou vajíček dvěma spermii, tudíž nesdílí stejnou genetickou informaci a liší se významně i ve fenotypových znacích. U MZ dvojčat to ovšem tak snadné není, protože sdílejí téměř identickou genetickou informaci, a tudíž i velmi podobný fenotyp. Avšak i mezi nimi lze nalézt určité rozdíly. V průběhu let došlo k mnoha zjištěním, která odhalují, že existují způsoby, jak tyto rozdíly detekovat a MZ dvojčata geneticky i epigeneticky odlišit (Fang et al., 2019; Li et al., 2013; Meng et al., 2023). Díky genetické podobnosti jsou navíc MZ dvojčata ideální možností, jak studovat vliv epigenetických modifikací a environmentálních faktorů na fenotyp (Fraga et al., 2005; Plomin & Daniels, 2011).

3.1 Bodové mutace

Bodová mutace, již lze označit také jako jednonukleotidovou variaci (SNV, z angl. single nucleotide variation), je změna v jednom konkrétním nukleotidu v sekvenci DNA. Tato změna může způsobit substituci, kdy se jeden nukleotid nahradí za jiný, inserci, při níž dojde k vložení nového nukleotidu do sekvence, nebo delecii, která ze sekvence odstraní jeden nukleotid. Tyto bodové mutace mohou být dědičné, ale nebývá výjimkou ani jejich spontánní vznik způsobený vnějšími faktory, jako jsou například UV záření či další mutagenní látky. Zatímco pro SNP je typické, že je změna v jednom nukleotidu přítomna v populaci ve frekvenci větší než 1 % (Kruglyak & Nickerson, 2001).

Při studii Weber-Lehmann et al. (2014) zkoumali vzorky spermií dvou MZ dvojčat a vzorek krve dítěte jednoho z dvojčat. Bylo detekováno pět *de novo* jednonukleotidových substitucí v otci a synovi pomocí celogenomového sekvenování metodou masivně paralelního sekvenování (MPS) a následně byla jejich existence potvrzena ještě Sangerovou sekvenovací technologií. Metoda MPS umožňuje rychlé sekvenování celého lidského genomu již během jednoho dne, díky čemuž je tento postup v porovnání s tradiční Sangerovou sekvenovací technologií, která vyžadovala téměř deset let pro kompletaci rozšifrování a zaměřuje se zejména na sekvenování kratších úseků, naprosto unikátní (Behjati & Tarpey, 2013). Tato metoda přináší revoluci v genetickém výzkumu a diagnostice zejména díky schopnosti současně sekvenovat miliony krátkých úseků. I přes vyšší chybovost MPS, jež se pohybuje mezi 0,5 až 15 % (v závislosti na použité platformě) a je tudíž vyšší než u tradiční Sangerovy sekvenovací technologie, může být tento nedostatek překonán vhodným pokrytím vzorku (Ballard et al., 2020).

Pro potvrzení, že mutace dítěti opravdu předal otec, byla testována také matčina krev. Aby mohlo dojít k posouzení, zda se mutace nacházejí i v dalších vzorcích, zkoumali také vzorky odebrané z bukální sliznice a krve obou dvojčat, kdy se tedy posuzovala přítomnost mutace ve vzorku jak v ektodermu, tj. bukální sliznici, tak i v mezodermu, jenž je zastoupen krví. V bukální sliznici byly následně detekovány 4 z 5 objevených mutací a v krvi se nacházela pouze jedna mutace. Tyto mutace byly objeveny na pěti autozomech, konkrétně na 4., 6., 11., 14. a 15. chromozomu, přičemž poměr mezi původní bází a bází mutovanou byl mezi 50 % / 50 % a 80 % / 20 %. Z výzkumu tedy vyplývá, že byla objevena metoda rozpoznávání MZ dvojčat na základě detekce SNP pomocí MPS. Pro verifikaci výsledků byla použita právě osvědčená metoda Sangerovy sekvenovací technologie, která výsledky MPS potvrdila (Weber-Lehmann et al., 2014).

3.2 Variabilita počtu kopií úseků DNA

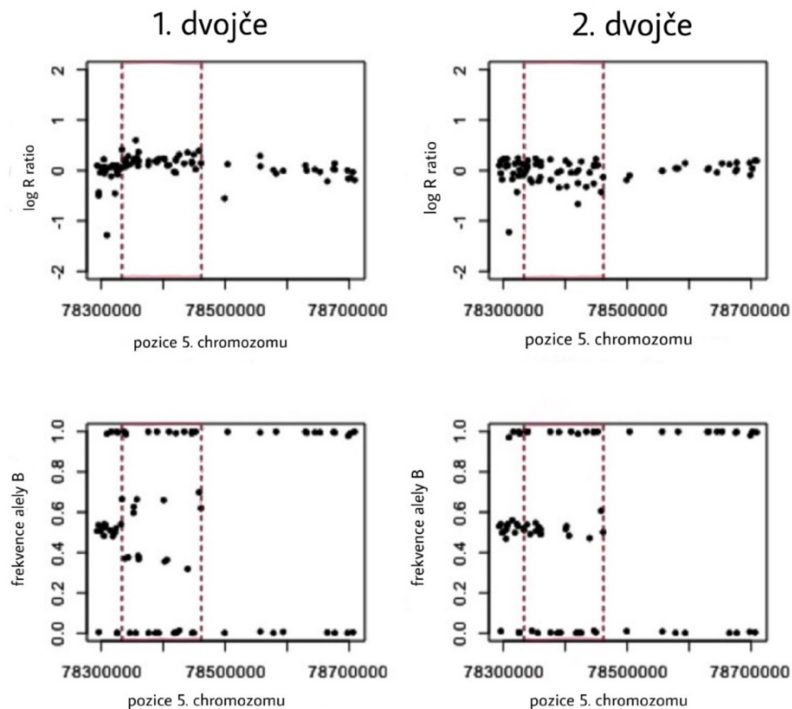
Analýza CNVs je metoda používaná v molekulární genetice, která se zabývá analýzou počtu kopií určité DNA sekvence v genomu jedince. V kontextu rozpoznávání MZ dvojčat je CNV využívána k porovnání genetické podobnosti mezi dvojčaty, ale i k identifikaci jejich rozdílů.

CNVs, jež jsou nejvíce prozkoumaným typem strukturálních variant, jsou úseky DNA o různé délce, které se různí v počtu kopií mezi jednotlivci v rámci jednoho druhu, a to v rozmezí od 1 kb až po několik Mb (Abdellaoui et al., 2015). CNVs jsou distribuovány v celém genomu, avšak zvýšená frekvence výskytu byla objevena v oblastech segmentální duplikace (Sharp et al., 2005).

I přesto, že vznik CNVs „post-twinning“ (tj. po rozdělení zygoty) *de novo* je brán jako určitá ojedinělost, je i tak častější než vytvoření post-twinning bodových mutací, neboť mají vyšší mutační rychlost, která způsobuje častější vznik mutací (Itsara et al., 2010).

Hledáním post-twinning *de novo* CNVs se zabývali Abdellaoui et al. (2015), kteří ve svém výzkumu pozorovali 1 097 párů MZ dvojčat a porovnávali hodnoty CNVs získané z krve nebo bukálního epitelu, čímž objevili 153 domnělých CNVs větších než 100 kb vzniklých post-twinning *de novo* pomocí metody microarray, z nichž byla většina lokalizována na dlouhém raménku 15. chromozomu, konkrétně 15q11.2. Z celkového počtu 153 identifikovaných CNVs bylo vybráno 20 konkrétních k další analýze pomocí qPCR. Dva byly ověřeny a výsledky naznačují, že většina ze zbývajících 133 předpokládaných *de novo* mutací pravděpodobně obsahovalo značný počet falešně pozitivních výsledků (Abdellaoui et al., 2015). Tyto falešně pozitivní výsledky mohou souviset s četnou přítomností segmentálních duplikací v oblasti 15q11.2 (Zody et al., 2006).

Při pozorování rozdílů mezi CN u 376 párů MZ dvojčat pomocí metody SNP array se podařilo McRae et al. (2015) objevit jeden pouhý rozdíl v CNV a to ~130 kb duplikaci na 5. chromozomu mezi pozicemi 78 333 027–78 460 944 bp (obr. 2). Vzhledem k tomu, že duplikace vykazuje v B alele přítomnost čtyř charakteristických genotypů (AAA, AAB, ABB, BBB), lze předpokládat, že se jedná nejspíše o mozaiku, což znamená, že tato duplikace není přítomna ve všech buňkách zkoumaného jedince (McRae et al., 2015).



Obr. 2 – diskordance počtu kopií v rámci jednoho páru MZ dvojčat, kde je znázorněna ~130 kb duplikace v oblasti vymezené červenou přerušovanou čarou u 1. dvojčete; vzrůst R hodnoty indikuje přítomnost této duplikace a čtyři charakteristické genotypy jsou taktéž znázorněny ve spodním levém grafu (převzato z Mcrae et al. (2015), upraveno autorkou)

3.3 Mitochondriální DNA

Heteroplasmie, neboli přítomnost různých variant mitochondriální DNA (tj. mtDNA) v jednom jedinci, je zajímavým fenoménem, který může přispívat variabilitě mezi jednotlivými MZ dvojčaty. Dříve se znalostí pouhé Sangerovy sekvenovací metody nešla téměř detekovat, avšak s rozvojem MPS již lze zjistit, jaké je procentulání zastoupení nukleotidů tvořících bodovou heteroplasmii (PHP). Na rozdíl od jaderného genomu je mtDNA v rámci jedné buňky přítomna v mnoha kopiích (Bouhlal et al., 2013). Savčí mtDNA kóduje 13 proteinů, které jsou součástí

jednotlivých podjednotek systému oxidativní fosforylace, také kóduje 22 tRNA a 2 rRNA (Park & Larsson, 2011) a je děděna maternálně (Hutchison et al., 1974).

Pro forenzní genetiku je však mtDNA důležitá zejména z hlediska vysoké mutační rychlosti, která je oproti mutační rychlosti jaderné DNA 10–20krát vyšší (Brown et al., 1979). Za takové zvýšení mutační rychlosti je zodpovědný nedostatek reparačních mechanismů a protektivních histonů, nebo generace reaktivních forem kyslíků (ROS) (Brown et al., 1979), které mimo jiné hrají svou roli také při procesu stárnutí (Galtier et al., 2009).

Wang et al. (2015) pozorovali 10 párů MZ dvojčat, jímž byly pro výzkum odebrány krevní vzorky. Pomocí celogenomového mtDNA sekvenování došlo k identifikaci 16 nukleotidových pozic, které vykazovaly rozlišné zastoupení bází v osmi párech MZ dvojčat, přičemž nukleotidové pozice nt207, nt240, nt16129, nt16183, nt16189 a nt16289 byly lokalizovány v kontrolním úseku hypervariabilní oblasti HVS 1 a HVS 2, a zbylých 10 pozic pochází z kódujícího úseku. MPS metoda odhalila PHP u jednoho páru MZ dvojčat. Jednalo se o pozici nt240, ve které měl jeden jedinec pouze adenin a u druhého jedince se nacházel v minoritním zastoupení 14,74 % i guanin. Pět párů MZ dvojčat vykazovalo také rozdílnou bázi v nukleotidové pozici nt15301, což je polymorfni místo, které je lokalizováno v kódující oblasti cytochromu b. Nukleotidová pozice nt1530 byla u jednoho vzorku z velké části tvořena zejména adeninem (88,01 %) a u párového vzorku činil adenin pouhých 9,40 % (Wang et al., 2015).

Hodnocení a porovnávání odlišných variant mtDNA v MZ dvojčatech se věnovali také Bouhlal et al. (2013), jež ve své studii pracovali jen s jedním párem MZ dvojčat a na základě komplementárních metod zjišťovali různé variace v jejich mitochondriální sekvenci. Výsledky ze zkoumání MZ dvojčat odhalily 37 variant, které byly nalezeny u obou MZ dvojčat. 34 z nich bylo tzv. homoplasmických a zbylé 3 varianty byly téměř homoplasmické. Při lokalizaci bylo 27 z celkových 37 variant objeveno na 12 genech napříč celým mitochondriálním genomem a 10 variant se nacházelo v HVS 1 a HVS 2.

Detekce odlišných variant byla ovšem nízkofrekvenční, tj. < 0,01 % (Bouhlal et al., 2013), což je v porovnání s předchozí studií (Wang et al., 2015), kde byla prahová hranice nastavena na 5 %, velice nízký limit. Tímto se tedy může vysvětlit velký rozdíl v počtu nalezených odlišných variant mtDNA. Při analýze mitochondriálního genomu použili Bouhlal et al. (2013) také velice pevná a specifická kritéria, a to například přesně danou kvalitu nukleotidů nebo že potenciální varianta musela být vzdálená nejméně pět bází od konce sekvenčního čtení.

3.4 Inaktivace X chromozomu

Inaktivace X chromozomu (XCI) se u žen vyskytuje v buňkách s cílem dosáhnout vyvážené exprese X-vázaných genů, neboť muži mají oproti ženám pouze jeden chromozom X (Lyon, 1961). XCI může způsobovat umlčení transkripce většiny genů na inaktivovaném X chromozomu, kdy pak nesouměrná či zešíkmená XCI představuje utlumení stejného X chromozomu ve většině nebo všech buňkách dané tkáně a může tak být výsledkem nejen selektivních, ale i náhodných procesů (Sharp et al., 2000). Zešíkmená XCI bývá podle Shvetsova et al. (2019) vysvětlována jako negativní selekce jedné z alel.

XCI tedy slouží jako možný způsob rozlišování MZ dvojčat ženského pohlaví. Tento jev je velice výhodný pro studium MZ dvojčat, protože pokud dojde u jednoho dvojčete k dysbalanci XCI, pak máme k dispozici jedno dvojče, které vykazuje nenáhodnou XCI, a druhé dvojče, které dysbalancí netrpí (Tiberio, 1994).

Zda bude inaktivován X chromozom právě od matky či od otce, je podmíněno již embryonálně (Loat et al., 2004). Inaktivace bývá náhodná pro jednotlivé buňky, ovšem zůstává stejná po celou dobu následných buněčných dělení (Loat et al., 2004). To znamená, že v okamžiku, kdy vznikne inaktivace, a to buď maternálního, anebo paternálního X chromozomu, zůstává tato inaktivace neměnná a je stabilně mitoticky děděna všemi dceřinými buňkami (Shvetsova et al., 2019). Vznik XCI v embryonálním stádiu potvrzuje studie Monteiro et al. (1998), neboť svými výsledky dokázali, že po porovnání podobnosti znaků inaktivace X chromozomu mají MC MZ dvojčata těchto společných znaků více než DC MZ dvojčata. XCI tedy musela proběhnout již před 4. dnem po oplodnění, neboť MZ dvojčata DC vznikají po rozdělení zygoty mezi 1.–3. dnem, načež mezi 4.–8. dnem vznikají již dvojčata MZ MC (Mackie et al., 2016). Ženy jsou tedy buněčnými mozaikami, protože se skládají z populace buněk s preferenční expresí otcovského, nebo mateřského X chromozomu (Shvetsova et al., 2019). Buněčnou mozaikou chápeme stav, kdy jsou buňky v těle geneticky odlišné, přičemž tento stav může nastat právě v důsledku XCI u žen.

Inaktivovaná alela je význačná zejména silnou metylací, přičemž existuje 15 % genů v PAR oblasti (pseudo-autozomální region), které se inaktivaci X chromozomu vyhnou a jejich promotorové oblasti obsahují výrazně méně metylací (Carrel & Willard, 2005).

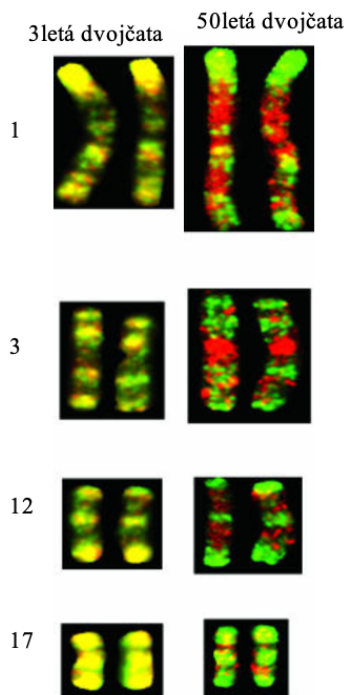
Při analýze MZ dvojčat došli Fraga et al. (2005) k výsledkům, že ze zkoumaných 16 MZ ženských dvojčat jich 13 (tj. 81 %) mělo totožnou metylaci X chromozomu. Mezi nimi se poté našlo 11 (tj. 85 %) MZ ženských dvojčat, u nichž byly nalezeny nezešíkmené náhodně metylované alely. Zbývající dvě MZ ženská dvojčata ze 13 (15 %) projevily zešíkmený vzor chromozomu X, ačkoliv byl tento vzor v každém případě shodný mezi jednotlivými sourozenci.

Při pozorování všech ženských MZ dvojčat bylo objeveno, že pouze tři ze 16 (19 %) měly zešíkmený vzor metylace X chromozomu, jež se lišil mezi odpovídajícími dvojčaty (Fraga et al., 2005).

3.5 Methylace DNA

Methylace DNA je typickým příkladem epigenetické změny, u níž nedochází k projevu na nukleotidové sekvenci, ale zpravidla bývá dědičná (Conerly & Grady, 2010) a závislá na vnějších faktorech (Xu et al., 2015). Mnoho studií uvádí, že páry MZ dvojčat vykazují jasné epigenetické rozdíly zahrnující metylaci DNA, přičemž celogenomová DNA methylace i lokus-specifická DNA methylace byly mezi jednotlivými dvojčaty taktéž rozdílné (Gordon et al., 2012; Poulsen et al., 2007).

Methylace DNA bývá katalyzována DNA metyltransferázami. Tyto enzymy mají za úkol přenést metylovou skupinu z methioninu, který je metabolizován na S-adenosylmethionin (SAM) na 5. uhlík cysteinu (Moore et al., 2013). Nejčastěji dochází k metylaci DNA v místech, kde se vyskytují oblasti CpG, což jsou místa, v nichž se nachází cytosin následovaný guaninem, přesněji se jedná o cytosin-fosfát-guanin dinukleotid (Turrina et al., 2021). Právě tato místa bývají důležitá z hlediska epigenetiky, protože CpG místa často podléhají metylaci a tím, že jsou v genomu zastoupeny ve vícero frekvencích, mohou snáze ovlivňovat regulaci genové exprese (Conerly & Grady, 2010). V lidském genomu se nachází zhruba 28 milionů CpG míst, které by se daly využít pro účely forenzního vyšetřování (Du et al., 2015). U MZ dvojčat bylo také zjištěno, že v mládí vykazují přibližně stejné množství DNA metylací, které se se zvyšujícím věkem začínají odlišovat nejen v množství, ale také ve vzorech DNA methylace. Toto bývá způsobeno zejména odlišným působením vnějších faktorů na jednotlivce v rámci páru MZ dvojčat, jejichž methylace DNA se časem mění (obr. 3) (Fraga et al., 2005).



Obr. 3 – metylace 1.,3.,12. a 17. chromozomu u 3letých a 50letých MZ dvojčat – zeleně a červeně jsou u starších dvojčat obarvena místa, která označují hypermetylacii a hypometylacii, naopak žlutě jsou u mladších dvojčat zvýrazněná místa, která mají stejnou distribuci metylace DNA a jsou tedy výsledkem rovnoměrného spojení červené a zelené barvy (převzato od Fraga et al. (2005), upraveno autorkou)

Metylací DNA jako metodou k rozpoznání MZ dvojčat se zabývali Li et al. (2013), kteří se snažili pomocí celoepigénomové analýzy identifikovat potenciální CpG místa, která by mohla sloužit k rozlišení 22 párů zkoumaných MZ dvojčat. Princip tohoto výzkumu je založen na využití metody Beadchip, pomocí níž zkoumali genomovou DNA, která byla ošetřena hydrogenuhličitánem sodným za účelem deaminace nemetylovaného cytosinu na uracil, přičemž metylované cytosiny zůstaly beze změny. Výsledkem tohoto výzkumu byla identifikace 3 616 CpG míst s různou metylací na základě dvou kritérií – $ABDs \geq 13$ a $ABD\beta \geq 0,17$. $ABDs$ vyjadřuje absolutní hodnotu tzv. „DiffScore“, který se zaměřuje na hodnocení rozdílné úrovně metylace na specifickém CpG místě v rámci každého páru MZ dvojčat a $ABD\beta$ zase popisuje absolutní hodnotu rozdílu β – hodnot v rámci každého páru MZ dvojčat, přičemž β – hodnoty se mohou pohybovat v hodnotách od 0, kdy je dané CpG místo zcela nemetylováno, do 1, což udává, že je určité CpG místo kompletně metylováno. Následně bylo vybráno 92 kandidátních CpG míst nacházejících se na 20 autozomech (vyjma 18. a 22. chromozomu) a X-chromozomu, jako nejvhodnějších na rozlišení všech 22 zkoumaných párů MZ dvojčat (Li et al., 2013).

Analýze metylace DNA se věnovali také Xu et al. (2015), kteří zkoumali metylaci LINE-1 pomocí pyrosekvenování. Pro tuto metodu je typická technika sekvenování pomocí syntézy, při níž dochází k monitorování syntézy DNA v daném okamžiku (Harrington et al., 2013). O možnosti pozorování DNA polymerizace na základě měření produkce pyrofosfátu, který může být následně detekován emisemi světla, se jako první zmínil Nyrén (1987).

Výsledky Xu et al. (2015) poukázaly na míru metylace třech CpG míst lokalizovaných v promotorové oblasti LINE-1. V krevních vzorcích tvořila hodnota míry metylace třech CpG míst v průměru 76,60 %. Získané hodnoty míry metylace LINE-1 tří CpG míst z bukálních vzorků se mírně lišily od výsledků krevních, zde činila průměrná hodnota míry metylace v bukálním stěru jen 70,08 %. Rozdíl mezi těmito průměrnými hodnotami udává, že ve specifických tkáních probíhá rozdílná míra metylace. Z celkových 119 párů MZ dvojčat nebyly objeveny žádné signifikantní rozdíly, vyjma 15 párů (tj. 12,61 %), které byly identifikovány na základě rozdílů v míře metylace LINE-1, které mohou být spojeny s rozdílným životním stylem, náhodnými procesy nebo odlišným prostředím, v němž dvojčata žijí (Xu et al., 2015).

Vidaki et al. (2018) se rozhodli pro detekci CpG míst s rozdílnou metylací u dvojčat (tDMSs, z angl. twin differentially methylated CpG sites) ve stěrech bukální sliznice, a dále ve vzorcích slin a nedopalků cigaret. V bukálních stěrech odhalili 25 tDMSs, které obsahovaly více než 0,5 rozdílů mezi jednotlivými dvojčaty, u vzorků slin zase 27,3 % tDMSs, které měly rozdíly větší než 0,1 a 31,8 % tDMSs, jejichž rozdíly byly menší, ale byly mezi dvojčaty spolehlivě detekovatelné. Na cigaretových nedopalcích bylo objeveno nejvíce rozdílů, konkrétně 50 % tDMSs mělo rozdíly mezi dvojčaty větší než 0,1 a 22,7 % tDMSs mělo rozdíly menší než 0,1, ale byly opět spolehlivě detekovatelné. Tyto rozdíly mezi výsledky z bukálních stěrů sloužících ve forenzním zkoumání jako srovnávací vzorky natipovaných osob a vzorků zjišťovaných jako stopy (sliny, nedopalky) lze vysvětlit odlišnostmi ve stavbě buněk nebo různými technickými faktory, včetně neefektivity bisulfitové konverze (Vidaki et al., 2018).

3.6 MikroRNA

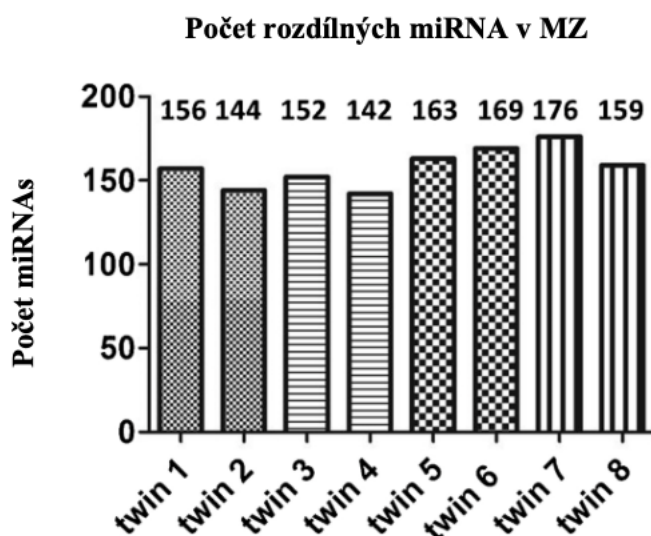
MikroRNA (zkráceně miRNA nebo miR) představují jednu ze skupin malých nekódujících RNA, které se podílejí na negativní posttranskripční regulaci genové exprese (Catalanotto et al., 2016). MiRNA bývají dlouhé zhruba 18 až 22 nukleotidů a existují v řadě eukaryotických buněk, kde hrají fundamentální roli v řadě biologických procesů – diferenciaci buněk, proliferaci, apoptóza, ale i v procesech stárnutí (Brennecke et al., 2003; Chen et al., 2004). Díky dvěma schopnostem – regulaci řady fyziologických procesů (hlavně procesu stárnutí) a tkáňové specifitě – jsou miRNA využívány ve forenzní vědě nejen jako biomarkery na identifikaci tělních tekutin a tkání (Weber et al., 2010), ale i pro potenciální určování věku (Noren Hooten et al., 2010). Bylo taktéž prokázáno, že miRNA může zasahovat do stability mRNA a že její využití nekončí pouze u odlišování MZ dvojčat (Weber et al., 2010), ale lze ji využít i na identifikaci tělních tekutin. Weber et al. (2010) došli k výsledku, že tělní tekutiny se

liší množstvím obsažených miRNA, např. plasma obsahuje největší množství specifických miRNA, kdežto naopak moč nebo pleurální výpotek neobsahují žádné specifické miRNA.

Ve výzkumu Xiao et al. (2019), kde bylo pozorováno 15 párů MZ dvojčat a jedny MZ trojčata, došlo k objevení celkem 545 miRNA, které se u sedmi párů MZ dvojčat odlišovaly svou expresí, a dále bylo mezi jednotlivými dvojčaty nalezeno v průměru 78 miRNA, jež měly taktéž odlišnou expresi. Stejně tak je ve studii uvedeno, že čím starší daný pár MZ dvojčat je, tím větší počet rozdílně exprimovaných miRNA se mezi dvěma sourozenci objevuje. Rozdíly v počtu miRNA u MZ dvojčat pozorovali Wu et al. (2016) a jako výsledek své studie uvedli, že tento rozdíl je způsoben nejpravděpodobněji environmentálními vlivy, jejichž příkladem může být například strava a v ní přijatý zinek (Ryu et al., 2011).

Ze všech zkoumaných rozdílně exprimovaných miRNA se prokázaly jako nejslibnější miRNA markery zejména miR-142-3p a miR-3653-3p lokalizované na chromozomech 17 a 22, neboť právě tyto dva markery vykazují rozdílnou expresi u všech párů zkoumaných MZ dvojčat s výjimkou nejmladšího páru. 214 rozdílně exprimovaných RNA bylo nepochybně nalezeno nejméně u dvou párů MZ dvojčat na všech chromozomech, s výjimkou chromozomu Y (Xiao et al., 2019), přičemž 40 miRNA z nich bylo také označeno jako související s věkem (Noren Hooten et al., 2010).

Studii rozlišování MZ dvojčat na základě miRNA věnovali také Fang et al. (2019), kteří zvolili metodu MPS a pozorovali čtyři páry MZ dvojčat. Analýza profilu miRNA pomocí MPS prokázala, že množství miRNA nalezené v krevním vzorku se u všech jedinců mírně liší a počet miRNA se pohybuje mezi 142–176 (obr. 4). Při porovnávání profilů exprese miRNA v rámci všech párů MZ dvojčat bylo objeveno 10–41 miRNA, které se lišily v rámci jednoho páru a v průměru 85 miRNA, které měly rozdílnou expresi mezi nepříbuznými jedinci. Jedinou rozdílnou miRNA prokazující se odlišně mezi všemi osmi pozorovanými jedinci byla miR-451a (Fang et al., 2019).



Obr. 4 – Počet detekovaných rozdílných miRNA v MZ dvojčatech; páry dvojčat jsou vždy znázorněny stejným vzorem ve sloupečku (převzato z Fang et al. (2019), upraveno autorkou)

Nepříbuzní jedinci vykazovali mnohem více rozdílů v miRNA expresi než jedinci příbuzní, což má logické vysvětlení – rozdíly v sekvencích genomové DNA. I přesto, že bylo za pomoci MPS získáno velké množství miRNA, byla rozdílná exprese, která vzniká působením vnějšího prostředí a tím ovlivňuje fyzický stav jednice, zaznamenána pouze u malé části objevených miRNA – zhruba 14 % (Fang et al., 2019).

Obě dvě výše uvedené studie (Fang et al., 2019 Xiao et al., 2019), které zkoumaly microRNA k rozpoznávání MZ dvojčat, objevily čtyři konkrétní miRNA – miR-451a, let-7c-5p, miR-151a-3p a miR-29b-3p, které se nacházely alespoň ve dvou párech MZ dvojčat, a proto je lze využít jako markery vhodné pro identifikaci MZ dvojčat.

3.7 Imunologické znaky

Ačkoliv nebyla doposud zaznamenána aplikace metody identifikace na základě imunitního repertoáru ve forenzním zkoumání, přináší tento typ nové možnosti, kterými je možné MZ dvojčata odlišit (Meng et al., 2023).

V každém jedinci se již od narození tvoří naprosto unikátní imunitní repertoár, který se skládá z vytvořených protilátek a odráží veškerou imunitní historii daného jedince. Jednou z možností, která zajišťuje rozmanitost imunitního repertoáru, je V(D)J oblast. Tato oblast je část genů, které kódují T-buněčný receptor – TCR (z angl. T-cell receptor) nebo B-buněčný receptor – BCR (z angl. B-cell receptor), a skládá se ze tří oblastí – V – část variabilní, D – část diverzitní a J – část spojovací, přičemž právě kombinace těchto segmentů během rekombinace zaručuje variabilitu receptorů, které jsou následně schopné rozpoznávat konkrétní antigeny a

tvoří tak základ pro adaptivní imunitní odpověď (Chi et al., 2020). TCR i BCR se liší svojí stavbou. T-cell receptory pro T-lymfocyty se tvoří z α a β řetězců, občasně také z řetězců γ a δ , kdežto B-cell receptory pro B-lymfocyty jsou složeny ze dvou těžkých a dvou lehkých řetězců (Cambier, 1992).

Meng et al. (2023) věnoval imunologickým znakům studii, ve které se zabýval analýzou diverzity CDR – komplementární určující oblast (z angl. complementary determining region 3). CDR jsou tři hypervariabilní smyčky ve variabilních oblastech na všech řetězcích TCR. V této studii došlo konkrétně k pozorování diverzity u čtyř párů MZ dvojčat v CDR3 jak v TCR β řetězci, tak i v BCR těžkého řetězce, který je známý také jako těžký řetězec imunoglobulinu (IGH) (Meng et al., 2023). Pro analýzu byl zvolen právě CDR3 v TCR β a IGH zejména kvůli tomu, že má klíčovou roli v rozpoznávání antigenů a má největší variabilitu (Chen et al., 2017).

Metoda výzkumu Meng et al. (2023) spočívala v izolaci T-lymfocytů a B-lymfocytů z periferní krve, z nichž byla poté extrahována genomová DNA. Pro následnou amplifikaci byly navrženy PCR primery v konzervovaných oblastech V a J genu na obou koncích CDR3 oblastí nejen TCR β , ale i BCR.

Během analýzy výsledků Meng et al. (2023) zjistili, že mezi zkoumanými MZ dvojčaty existují rozdíly ve frekvencích výskytu různých délek aminokyselinových (AMK) sekvencí CDR3 T-lymfocytárních receptorů β . Konkrétně se jednalo o 4–10 rozdílů ve frekvencích výskytu délek AMK sekvencí a 2–7 rozdílů ve frekvencích výskytu délek sekvencí nukleové kyseliny CDR3 TCR β . Z toho tedy vyplývá, že mezi MZ dvojčaty existuje odlišný počet variant aminokyselinových sekvencí v oblasti CDR3 receptoru T-lymfocytů β , a i odlišný počet variant nukleotidových sekvencí ve stejné oblasti, kdy tyto odlišné varianty mají délku 34 bp. Mimo jiné došlo k vyzorování, že se všechny páry MZ dvojčat liší ve frekvenci použití genů TRBJ2-3 a že každý pár má unikátní způsob kombinace genů V a J v DNA sekvencích TCR β a těžkém řetězci BCR CDR3 (Meng et al., 2023).

4. Využití markerů pro forenzní identifikaci z biologického vzorku

V předchozí kapitole byly vyjmenovány metody, které mohou být využity pro rozpoznávání MZ dvojčat. Ovšem každá z těchto metod má specifické vlastnosti, a proto některé z nich nemusí být příliš vhodné pro účely forenzní identifikace, jelikož biologické stopy nalezené na místě činu mohou být pouze v malém množství nebo horší kvality. V této kapitole tedy hodnotím vhodnost zmíněných markerů pro forenzní účely, možnosti jejich využití a za jakých okolností se mohou dané metody aplikovat.

Vhodnost metody je potřeba přizpůsobit typu analyzovaného materiálu a jeho množství a stupni degradace. Zpravidla se jedná o krev, sperma, sliny, či epiteliální buňky pocházející z dotekových stop. Obecně lze říct, že dotekové stopy, které vznikají uvolněním několika epiteliálních buněk při kontaktu kůže s předmětem, poskytují menší množství biologického materiálu k analýze nežli tzv. silné stopy jako je sperma, sliny, či krev. Je také důležité vědět, zda vzorek pochází od jedné osoby nebo zda se jedná o směsný vzorek více osob, což je vhodné nejdříve ověřit fragmentační analýzou STRs. Obecně nejspolehlivějším vzorkem pro identifikaci osob z biologických stop je molekula DNA (Brenner & Weir, 2003), která také díky své sekundární struktuře vykazuje v porovnání s RNA mnohem vyšší stabilitu. Avšak i DNA je náchylná k degradaci, která může být způsobena UV zářením a jinými enviromentálními vlivy, například superoxidovými radikály nebo peroxidem vodíku, které vznikají buď ionizující radiací, ale i metabolickými aktivitami mikroorganismů (Alaeddini et al., 2010). Kvůli četným degradačním procesům, jež postihují forenzní vzorky, je nutné zvýšit zastoupení možných DNA markerů (Machida et al., 2017). Ideálním řešením může být tedy osekvenování celého genomu natipovaných MZ dvojčat pomocí MPS za účelem nalezení bodových mutací, které jsou specifické pro jedno z dvojčat (Krawczak et al., 2012). Po detekci zájmových oblastí lze tyto oblasti osekvenovat u zajištěné biologické stopy z místa činu a porovnat je s každým dvojčetem, abychom zjistili, zda se shodují (Yuan et al., 2020). Výhodou této metody je menší náročnost na vstupní množství DNA u biologické stopy, jelikož zájmové oblasti detekujeme ze srovnávacího materiálu zajištěného od MZ dvojčat. To ovšem vyžaduje spolupráci obou dvojčat, vinného i nevinného.

Zvolení vhodného srovnávacího materiálu je pro forenzní genetiku klíčové. Závisí totiž na typu tkáně, kterou v danou chvíli analyzujeme. Detekovatelná změna v genetické informaci může vzniknout kdykoliv během embryogeneze, kvůli čemuž se pak mutace může nacházet ve všech zárodečných vrstvách, nebo naopak jen v jedné. Většina analyzovaných vzorků, včetně bukálního stěru, spermatu i dotekových stop, je ektodermálního původu, a proto jsou v jaderné

DNA těchto vzorků zpravidla detekovatelné stejné mutace (Weber-Lehmann et al., 2014). Výjimku tvoří krev, jež je mezodermálního původu (Ferretti & Hadjantonakis, 2019), což má za následek nepřítomnost některých mutací (viz kapitolu 2.1). Je tedy vhodné zvolit krev jako srovnávací materiál zejména v případech, kdy analyzujeme krev jako biologickou stopu z místa činu. Jako vhodný srovnávací vzorek tedy ve forenzní genetice figuruje bukální stěr, protože je stejně jako dotekové stopy, kožní šupiny, vlasy nebo již zmíněné sperma, ektodermálního původu a je pro případy kriminalistiky eticky i právně snáze získatelný (Weber-Lehmann et al., 2014).

Nevýhodou celogenomového sekvenování, při němž detekujeme SNPs, je jeho vysoká cena a taky časová náročnost. Yuan et al. (2020) se tedy domnívají, že by tento zdlouhavý proces mohl být nahrazen analýzou celého mitochondriálního genomu, kde je pravděpodobnost vzniku mutací či heteroplasmie vyšší, a to díky vyšší mutační rychlosti mtDNA oproti jaderné DNA (Brown et al., 1979). Pro účely forenzního dokazování využili Yuan et al. (2020) metodu celogenomového sekvenování DNA pomocí MPS u biologických stop pocházejících ze čtyř trestných činů za účelem rozlišení MZ dvojčat. Jako srovnávací vzorek byla použita krev od obou dvojčat a následně i další druhy biologického materiálu. Detekované rozdíly v mtDNA následně použili jako důkaz pro vyloučení jednoho dvojčete jako zůstavitele zkoumaných biologických stop a druhé dvojče bylo posléze soudem usvědčeno ze spáchání několika znásilnění a jedné vraždy.

Ve zmiňovaném případě se analýzou jaderného genomu nepodařilo detekovat bodové mutace, které by vedly k rozlišení MZ dvojčat. Ovšem analýzou celé mtDNA byla objevena jedna somatická mutace m.6903 T > C u jednoho z dvojčat, kde byly zaznamenány dvě báze v jednom lokusu a cytosin byl označen za minoritní alelu. Při analýze smíšených vzorků z 1. a 2. případu byla mutace m.6903 T > C detekována, avšak ve stopách z 3. a 4. případu tato mutace nalezena nebyla. Proto byla provedena detekce SNPs i ve spermatických vzorcích sloužících jako srovnávací materiál u obou MZ dvojčat. Ve srovnávacím vzorku jednoho dvojčete byly objeveny dva heterogenní lokusy, které však nebyly objeveny v žádné stopě pocházející z místa činu, a tudíž se podařilo toto dvojče vyloučit. V tomto případě se analýza mtDNA prokázala jako užitečnější nežli analýza jaderného genomu, jelikož vedla k identifikaci jednoho dvojčete (Yuan et al., 2020).

Sekvenování mitochondriálního genomu také slouží jako alternativní metoda pro rozpoznávání MZ dvojčat v případě, kdy vzorek postrádá intaktní jadernou DNA (Strobl et al., 2018). Ani tento marker ale není stoprocentní a má pro forenzní účely určité nedostatky. Některé objevené rozdíly v mtDNA, které jsou příliš malé, totiž nemusí být u soudu dostačující

(Fang et al., 2019). Toto ovšem platí i pro ostatní zmíněné markery. Jako další nevýhoda figuruje nutnost osekvenovat stejné typy biologického materiálu, protože se mtDNA heteroplasmie mohou lišit v závislosti na typu tkáně, a proto je nutné, aby stopy z místa činu a srovnávací vzorky osob pocházely ze stejné tkáně a mohlo tak dojít k jejich porovnání (Wang et al., 2015).

Nadějnými metodami pro možné rozlišení MZ dvojčat jsou CNV a XCI. CNV markery lze využít i pro identifikaci tělních tkání, a to například pro stopy krve nebo spermatu zanechané na místě činu nebo těle oběti (Zubakov et al., 2018), popřípadě lze určit i buňkové stěry (Abdellaoui et al., 2015). Hlavní výhodou při vyhodnocování CNV je zvýšená frekvence výskytu v oblastech segmentální duplikace (Sharp et al., 2005), takže zhruba známe úseky, kde by se se zvýšenou pravděpodobností mohly CNVs nacházet. Pro většinu metod vhodných pro detekci CNVs je zapotřebí srovnání vzorků z místa činu se srovnávacími vzorky osob, kde by měl být počet kopií znám, aby se mohly výsledky potvrdit (Ueki et al., 2017). Tyto vzorky ale při spolupráci obou dvojčat dokážeme získat a tím pádem je možné vzorky od obou dvojčat porovnat se vzorky referenčními. Avšak výzkumy byly doposud zaměřeny zejména na využití CNVs k detekci různých onemocnění, například epilepsie (de Kovel et al., 2010), a proto je nutné ještě tyto markery prostudovat v souvislosti s forezním využitím. Pro MZ dvojčata ženského původu je možné použít také metodu XCI, u které byla objevena vysoká spojitost s tkáňovou specifikou, přičemž krevní vzorky obsahovaly největší prevalenci zešíklé XCI (Zito et al., 2019). Vzorky krve tedy musí být porovnávány pouze se vzorky krve, abychom se vyhnuli případným chybám v detekci. Kvůli analýze jediného typu vzorku – krve, uvádí Zito et al. (2019) ve své studii, že by mohlo dojít k problému při hledání XCI i z jiných typů vzorků, protože by jich v dané tkáni nemusel být dostatek, kvůli čemuž by tedy nemusely být MZ dvojčata rozpoznána. Mimo jiné došlo také ke zjištění, že je XCI sdílána napříč buňkami imunitního systému (Zito et al., 2019).

Jak miRNA, tak i metylace DNA jsou užitečné pro identifikaci MZ dvojčat, protože právě u těchto dvou markerů byly objeveny konkrétní oblasti lišící se u většiny zkoumaných MZ dvojčat, tudíž není potřeba provádět celogenomový screening a stačí se zaměřit pouze na několik málo kandidátních úseků (Li et al., 2013; Xiao et al., 2019).

V případě miRNA se jedná zejména o 17. a 22. chromozom, na nichž se nachází dvě rozdílně exprimované miRNA, konkrétně miR-142-3p a miR-3653-3p (Xiao et al., 2019). Mimo jiné miRNA vyčnívá také ve své vysoké specifitě, díky níž je možné identifikovat tělní tekutiny. Některé miRNA jsou přítomné ve všech testovaných tělních tekutinách, ovšem jejich koncentrační zastoupení se v závislosti na dané tekutině liší. Výskyt některých jednotlivých

miRNA je různý mezi tělními tekutinami (Weber et al., 2010), a proto je nutné brát tuto skutečnost na vědomí při detekci rozdílně exprimovaných miRNA u jiných tělních tekutin, než je krev, v níž byly tyto dva konkrétní markery detekovány (Xiao et al., 2019). Také může být problematické využít miRNA u vzorků, kde se mísí více tělních tekutin a více osob, což je velice časté například u znásilnění. V těchto případech je lepší využívat analýzu jaderné DNA nebo mtDNA, kde je jednodušší tyto původce stopy rozlišit, zjistit jejich poměrové zastoupení ve směsi a případně připravit testovací vzorky se shodným zastoupením jednotlivých přispěvatelů (Yuan et al., 2020). U miRNA se také zkoumala stabilita vzorku po dobu jednoho roku. Tento vzorek byl uchováván za laboratorních podmínek, tj. ve stálé vlhkosti a teplotě a nebyl vystaven UV světlu, a i přesto vykazoval velmi podobnou expresi jako čerstvé vzorky (Zubakov et al., 2010). Ovšem mimo laboratoř působí na miRNA vnější vlivy, a proto vzorky časem podléhají degradaci nebo ztrátě funkce (Alaeddini et al., 2010).

Stejně tak i u metylace DNA bylo detekováno 92 kandidátních CpG míst na X chromozomu a na 20 autosomech, kromě 18. a 22. chromozomu (Li et al., 2013), na něž se můžeme při detekci zaměřit (viz kapitolu 3.5). Standardně se na detekci metylace DNA využívá metoda bisulfitové konverze. Tato metoda vyžaduje velké množství vstupního materiálu, jelikož během reakce dochází k degradaci a fragmentaci velké části analyzované DNA, a to z důvodu působení NaHSO₃, nízkého pH a vysoké teploty. Na místě činu se může nalézt jen malé množství biologického materiálu, které by pro bisulfitovou konverzi mohlo být nedostačující. Metylce DNA slouží jako epigenetický marker, jenž se v průběhu života mění (Xu et al., 2015), a proto její využití ve forenzním odvětví nekončí jen u detekce rozdílů u MZ dvojčat. Lze ji využít i pro identifikaci původu tkáně (Park et al., 2014). Metylce DNA je totiž odlišná pro specifické tkáně, a tudíž vhodná pro identifikaci tělních tekutin, přičemž s tkáňově-specifickými funkcemi je spojena především hypometylce (Lokk et al., 2014). Podobně jako u miRNA je tedy i u metylace DNA důležité, aby biologický materiál ze stopy byl porovnán se stejným biologickým materiálem srovnávacího vzorku. Při opakující se trestné činnosti osoby je navíc potřeba zajišťovat vzorek ke každému činu zvlášť, jelikož je metylce DNA v čase proměnná.

Nejméně prozkoumanou metodou pro rozpoznávání MZ dvojčat jsou rozdílné imunitní systémy. Jako první se fyziologickým rozdílním imunitních systémů mezi MZ dvojčaty, jako potenciálním markerem pro jejich rozpoznávání, věnovali Meng et al. (2023), kteří však uvádí, že v jejich studii byly zkoumány pouze čtyři páry MZ dvojčat, a proto se domnívají, že by analýzou většího vzorku mohlo být objeveno vícero rozdílů. Avšak i v tomto malém vzorku byly u všech párů MZ dvojčat objeveny rozdíly v CDR3 oblasti na TCRβ řetězci, z čehož pro

forezní identifikaci vychází imunitní systém jako další možnost pro rozlišení MZ dvojčat (Meng et al., 2023). Imunitní systém má oproti epigenetickým markerům výhodu díky své vysoké stabilitě, která u jedinců zůstává neměnná a zaručuje individualitu jedinců (Dupic et al., 2021). Změny v imunitním systému jsou ovlivněny nejen faktory z vnějšího prostředí, ale stavba TCR β závisí i na genetických faktorech (Zvyagin et al., 2014). Rozdíly v imunitních systémech se přímo nabízí k využití identifikace MZ dvojčat, avšak tento marker potřebuje ještě další výzkumy, aby mohl být aplikován i do forezní praxe.

5. Závěr

V rámci této bakalářské práce byly zkoumány nové možnosti pro rozpoznávání MZ dvojčat, což je velice složitý, nikoliv však nemožný, proces, kterým se forenzní experti zabývají již pár dekád. Tím, že jsou MZ dvojčata výsledkem rozdělení jedné oplodněné zygoty, sdílí téměř totožnou genetickou informaci, ve které lze i přes určité obtížnosti nalézt rozdíly, jimiž je možné jedince odlišit. Markerů pro rozlišení je celá řada, avšak neexistuje žádný univerzální typ markeru, který by byl vhodný pro všechny případy. Tato bakalářská práce zkoumala bodové mutace, variabilitu počtu kopií, inaktivaci X chromozomu u MZ dvojčat ženského pohlaví, mtDNA, microRNA, metylaci DNA a rozdíly v imunitních systémech MZ dvojčat.

Před aplikací metody na konkrétní případ je nutné zvážit všechny náležité okolnosti a faktory, které by mohly ovlivnit průběh detekce rozlišovacích markerů. U všech typů přístupů je důležité vědět, s jakou tkání pracujeme. V některých případech – např. u miRNA nebo metylace DNA – je klíčové porovnávání biologického materiálu ze stopy se stejným biologickým materiálem srovnávacího vzorku, popřípadě je nutné alespoň porovnávat vzorky s totožným tkáňovým původem.

I přesto, že jsou některé markery ve forenzním kontextu prozkoumány více než ostatní, měla by k nim i ostatním možným markerům stále směřovat pozornost, aby se lépe prozkoumal jejich potenciál pro aplikaci na konkrétní forenzní případy. Dosavadní výzkumy se totiž primárně soustředily spíše na biomedicinské odvětví, a tak jsou tyto markery prostudovány zejména v souvislosti s určitými poruchami či chorobami. Za posledních deset let se však rozrostla škála použitelných markerů, díky nimž je nyní možné objasnit případy, které byly dříve odloženy kvůli nedostatkům tehdy dostupných metod pro rozlišování MZ dvojčat.

6. Seznam použité literatury

- Abdellaoui, A., Ehli, E. A., Hottenga, J. J., Weber, Z., Mbarek, H., Willemsen, G., Van Beijsterveldt, T., Brooks, A., Hudziak, J. J., Sullivan, P. F., De Geus, E. J., Davies, G. E., & Boomsma, D. I. (2015). CNV concordance in 1,097 MZ twin pairs. *Twin Research and Human Genetics, 18*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1017/thg.2014.86>
- Alaeddini, R., Walsh, S. J., & Abbas, A. (2010). Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—A review. *Forensic Science International: Genetics, 4*(3), 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.09.007>
- Ballard, D., Winkler-Galicki, J., & Wesoly, J. (2020). Massive parallel sequencing in forensics: advantages, issues, technicalities, and prospects. In *International Journal of Legal Medicine* (Vol. 134, Issue 4, pp. 1291–1303). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02294-0>
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition, 98*(6), 236–238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
- Blickstein, I. (2020). Biology of monozygotic twinning. In *Developmental and Fetal Origins of Differences in Monozygotic Twins: From Genetics to Environmental Factors* (pp. 6–58). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820047-6.00002-3>
- Bortolus, R., Parazzini, F., Chatenoud, L., Benzi, G., Bianchi, M. M., & Marini, A. (1999). The epidemiology of multiple births. In *Human Reproduction Update* (Vol. 5, Issue 2).
- Bouhlal, Y., Martinez, S., Gong, H., Dumas, K., & Shieh, J. T. C. (2013). Twin mitochondrial sequence analysis. *Molecular Genetics and Genomic Medicine, 1*(3), 174–186. <https://doi.org/10.1002/mgg3.20>
- Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2003). bantam Encodes a Developmentally Regulated microRNA that Controls Cell Proliferation and Regulates the Proapoptotic Gene hid in Drosophila of cell growth and division have been characterized in the imaginal discs, including components of the Insulin/ PI3Kinase pathway, the Myc, Ras and E2F oncogenes, and Cyclin D/CDK4 (reviewed in Johnston and Gallant, 2002). In spite of this considerable progress, how inter. In *Cell* (Vol. 113). Prober and Edgar. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00231-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00231-9)

- Brenner, C. H., & Weir, B. S. (2003). Issues and strategies in the DNA identification of World Trade Center victims. *Theoretical Population Biology*, 63(3), 173–178.
[https://doi.org/10.1016/S0040-5809\(03\)00008-X](https://doi.org/10.1016/S0040-5809(03)00008-X)
- Brown, W. M., George, M., & Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(4), 1967–1971. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1967>
- Butler, J. M. (2007). Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *BioTechniques*, 43(4), Sii-Sv. <https://doi.org/10.2144/000112582>
- Cambier, J. (1992). Signal transduction by T- and B-cell antigen receptors: converging structures and concepts. *Current Opinion in Immunology*, 4(3), 257–264.
[https://doi.org/10.1016/0952-7915\(92\)90074-O](https://doi.org/10.1016/0952-7915(92)90074-O)
- Carrel, L., & Willard, H. F. (2005). X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*, 434(7031), 400–404.
<https://doi.org/10.1038/nature03479>
- Catalanotto, C., Cogoni, C., & Zardo, G. (2016). MicroRNA in control of gene expression: An overview of nuclear functions. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms17101712>
- Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F., & Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. *Science*, 303(5654), 83–86.
<https://doi.org/10.1126/science.1091903>
- Chen, H., Zou, M., Teng, D., Zhang, J., & He, W. (2017). Characterization of the diversity of T cell receptor $\gamma\delta$ complementary determinant region 3 in human peripheral blood by Immune Repertoire Sequencing. *Journal of Immunological Methods*, 443, 9–17.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.01.009>
- Chi, X., Li, Y., & Qiu, X. (2020). V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. In *Immunology* (Vol. 160, Issue 3, pp. 233–247). Blackwell Publishing Ltd.
<https://doi.org/10.1111/imm.13176>

- Conerly, M., & Grady, W. M. (2010). Insights into the role of DNA methylation in disease through the use of mouse models. In *DMM Disease Models and Mechanisms* (Vol. 3, Issues 5–6, pp. 290–297). <https://doi.org/10.1242/dmm.004812>
- De Felici, M. (2013). Origin, Migration, and Proliferation of Human Primordial Germ Cells. In *Oogenesis* (pp. 19–37). Springer London. https://doi.org/10.1007/978-0-85729-826-3_2
- de Kovel, C. G. F., Trucks, H., Helbig, I., Mefford, H. C., Baker, C., Leu, C., Kluck, C., Muhle, H., von Spiczak, S., Ostertag, P., Obermeier, T., Kleefuss-Lie, A. A., Hallmann, K., Steffens, M., Gaus, V., Klein, K. M., Hamer, H. M., Rosenow, F., Brilstra, E. H., ... Sander, T. (2010). Recurrent microdeletions at 15q11.2 and 16p13.11 predispose to idiopathic generalized epilepsies. *Brain*, *133*(1), 23–32. <https://doi.org/10.1093/brain/awp262>
- Du, Q., Zhu, G., Fu, G., Zhang, X., Fu, L., Li, S., & Cong, B. (2015). A Genome-Wide Scan of DNA Methylation Markers for Distinguishing Monozygotic Twins. *Twin Research and Human Genetics*, *18*(6), 670–679. <https://doi.org/10.1017/thg.2015.73>
- Dupic, T., Bensouda Koraichi, M., Minervina, A. A., Pogorelyy, M. V., Mora, T., & Walczak, A. M. (2021). Immune fingerprinting through repertoire similarity. *PLOS Genetics*, *17*(1), e1009301. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009301>
- Fang, C., Zhao, J., Liu, X., Zhang, J., Cao, Y., Yang, Y., Yu, C., Zhang, X., Qian, J., Liu, W., Wu, H., & Yan, J. (2019). MicroRNA profile analysis for discrimination of monozygotic twins using massively parallel sequencing and real-time PCR. *Forensic Science International: Genetics*, *38*, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.09.011>
- Ferretti, E., & Hadjantonakis, A. K. (2019). Mesoderm specification and diversification: from single cells to emergent tissues. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 61, pp. 110–116). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.07.012>
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L., Heine-Suñer, D., Cigudosa, J. C., Urioste, M., Benitez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T. D., Wu, Y.-Z., ... Esteller, M. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic

- twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(30), 10604–10609.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0500398102>
- Galtier, N., Jobson, R. W., Nabholz, B., Glémin, S., & Blier, P. U. (2009). Mitochondrial whims: metabolic rate, longevity and the rate of molecular evolution. *Biology Letters*, 5(3), 413–416. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0662>
- Gilbert, S. F. (2000). *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. An Introduction to Early Developmental Processes. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9992/>
- Gilbert, S. F. (2000). *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; *Comparative Embryology*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9974/>
- Gilbert, S. F., Opitz, J. M., & Raff, R. A. (1996). REVIEW Resynthesizing Evolutionary and Developmental Biology. In *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* (Vol. 173).
- Gordon, L., Joo, J. E., Powell, J. E., Ollikainen, M., Novakovic, B., Li, X., Andronikos, R., Cruickshank, M. N., Conneely, K. N., Smith, A. K., Alisch, R. S., Morley, R., Visscher, P. M., Craig, J. M., & Saffery, R. (2012). Neonatal DNA methylation profile in human twins is specified by a complex interplay between intrauterine environmental and genetic factors, subject to tissue-specific influence. *Genome Research*, 22(8), 1395–1406.
<https://doi.org/10.1101/gr.136598.111>
- Hamamy, H. A., Ajlouni, H. K., & Ajlouni, K. M. (2004). Familial Monozygotic Twinning: Report of an Extended Multi-generation Family. *Twin Research*, 7(03), 219–222.
<https://doi.org/10.1375/twin.7.3.219>
- Harrington, C. T., Lin, E. I., Olson, M. T., & Eshleman, J. R. (2013). Fundamentals of Pyrosequencing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 137(9), 1296–1303.
<https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0463-RA>
- Harvey, M. A. S., Huntley, R. M. C., & Smith, D. W. (1977). Familial monozygotic twinning. *The Journal of Pediatrics*, 90(2), 246–248. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(77\)80640-9](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(77)80640-9)

- Hutchison, C. A., Newbold, J. E., Potter, S. S., & Edgell, M. H. (1974). Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, *251*(5475), 536–538.
<https://doi.org/10.1038/251536a0>
- Itsara, A., Wu, H., Smith, J. D., Nickerson, D. A., Romieu, I., London, S. J., & Eichler, E. E. (2010). De novo rates and selection of large copy number variation. *Genome Research*, *20*(11), 1469–1481. <https://doi.org/10.1101/gr.107680.110>
- Krawczak, M., Cooper, D. N., Fändrich, F., Engel, W., & Schmidtke, J. (2012). How to distinguish genetically between an alleged father and his monozygotic twin: A thought experiment. In *Forensic Science International: Genetics* (Vol. 6, Issue 5). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.11.003>
- Kruglyak, L., & Nickerson, D. A. (2001). Variation is the spice of life. *Nature Genetics*, *27*(3), 234–236. <https://doi.org/10.1038/85776>
- Lee, K. A., Oh, K. J., Lee, S. M., Kim, A., & Jun, J. K. (2010). The frequency and clinical significance of twin gestations according to zygosity and chorionicity. *Twin Research and Human Genetics*, *13*(6), 609–619. <https://doi.org/10.1375/twin.13.6.609>
- Li, C., Zhao, S., Zhang, N., Zhang, S., & Hou, Y. (2013). Differences of DNA methylation profiles between monozygotic twins' blood samples. *Molecular Biology Reports*, *40*(9), 5275–5280. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2627-y>
- Liu, S., Hong, Y., Cui, K., Guan, J., Han, L., Chen, W., Xu, Z., Gong, K., Ou, Y., Zeng, C., Li, S., Zhang, D., & Hu, D. (2018). Four-generation pedigree of monozygotic female twins reveals genetic factors in twinning process by whole-genome sequencing. *Twin Research and Human Genetics*, *21*(5), 361–368. <https://doi.org/10.1017/thg.2018.41>
- Loat, C. S., Asbury, K., Galsworthy, M. J., Plomin, R., & Craig, I. W. (2004). X Inactivation as a Source of Behavioural Differences in Monozygotic Female Twins. *Twin Research*, *7*(01), 54–61. <https://doi.org/10.1375/twin.7.1.54>
- Lokk, K., Modhukur, V., Rajashekar, B., Märtens, K., Mägi, R., Kolde, R., Koltšina, M., Nilsson, T. K., Vilo, J., Salumets, A., & Tõnisson, N. (2014). DNA methylome profiling of human tissues identifies global and tissue-specific methylation patterns. *Genome Biology*, *15*(4). <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-4-r54>

- Lyon, M. F. (1961). Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, *190*(4773), 372–373. <https://doi.org/10.1038/190372a0>
- Machida, M., Taki, T., & Kibayashi, K. (2017). Screening for single nucleotide polymorphisms in highly degraded DNA by using the amplified fragment length polymorphism technique. *Forensic Science International: Genetics*, *31*, 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.08.007>
- Machin, G. (2009). Familial monozygotic twinning: A report of seven pedigrees. *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics*, *151*(2), 152–154. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30211>
- Mackie, F. L., Morris, R. K., & Kilby, M. D. (2016). Multiple Gestation: biology and epidemiology. *The Global Library of Women's Medicine*. <https://doi.org/10.3843/glowm.10486>
- Mani, S., Ghosh, J., Coutifaris, C., Sapienza, C., & Mainigi, M. (2020). Epigenetic changes and assisted reproductive technologies. In *Epigenetics* (Vol. 15, Issues 1–2, pp. 12–25). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1646572>
- Matias, A., Silva, S., & Blickstein, I. (2020). Mechanisms of discordance in monozygotic twins: why and when? In *Developmental and Fetal Origins of Differences in Monozygotic Twins: From Genetics to Environmental Factors* (pp. 60–77). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820047-6.00003-5>
- Mcrae, A. F., Visscher, P. M., Montgomery, G. W., & Martin, N. G. (2015). Large autosomal copy-number differences within unselected monozygotic twin pairs are rare. *Twin Research and Human Genetics*, *18*(1), 13–18. <https://doi.org/10.1017/thg.2014.85>
- Meng, D., Zhou, P., Li, M., Xu, J., Lu, L., Guo, Y., Yu, C., Xu, Y., Xu, X., Fang, C., & Yan, J. (2023). Distinguishing between monozygotic twins' blood samples through immune repertoire sequencing. *Forensic Science International: Genetics*, *64*. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2023.102828>
- Monteiro, J., Derom, C., Vlietinck, R., Kohn, N., Lesser, M., & Gregersen, P. K. (1998). Commitment to X Inactivation Precedes the Twinning Event in Monozygotic MZ Twins. In *Am. J. Hum. Genet* (Vol. 63).

- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 38, Issue 1, pp. 23–38).
<https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- Noren Hooten, N., Abdelmohsen, K., Gorospe, M., Ejiogu, N., Zonderman, A. B., & Evans, M. K. (2010). microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. *PLoS ONE*, *5*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010724>
- Nyrén, P. (1987). Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. *Analytical Biochemistry*, *167*(2), 235–238. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90158-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90158-8)
- Parazzini, F., Cipriani, S., Bianchi, S., Bulfoni, C., Bortolus, R., & Somigliana, E. (2016). Risk of Monozygotic Twins after Assisted Reproduction: A Population-Based Approach. *Twin Research and Human Genetics*, *19*(1), 72–76. <https://doi.org/10.1017/thg.2015.96>
- Park, C. B., & Larsson, N. G. (2011). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 193, Issue 5, pp. 809–818).
<https://doi.org/10.1083/jcb.201010024>
- Park, J. L., Kwon, O. H., Kim, J. H., Yoo, H. S., Lee, H. C., Woo, K. M., Kim, S. Y., Lee, S. H., & Kim, Y. S. (2014). Identification of body fluid-specific DNA methylation markers for use in forensic science. *Forensic Science International: Genetics*, *13*, 147–153.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.07.011>
- Plomin, R., & Daniels, D. (2011). Why are children in the same family so different from one another? *International Journal of Epidemiology*, *40*(3), 563–582.
<https://doi.org/10.1093/ije/dyq148>
- Poulsen, P., Esteller, M., Vaag, A., & Fraga, M. F. (2007). The epigenetic basis of twin discordance in age-related diseases. *Pediatric Research*, *61*(5 PART 2 SUPPL.).
<https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e31803c7b98>
- Ryu, M.-S., Langkamp-Henken, B., Chang, S.-M., Shankar, M. N., & Cousins, R. J. (2011). Genomic analysis, cytokine expression, and microRNA profiling reveal biomarkers of human dietary zinc depletion and homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(52), 20970–20975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117207108>

- Saito, H., Tsutsumi, O., Noda, Y., & Hiroi, M. (2000). Do assisted reproductive technologies have effects on the demography of monozygotic twinning? In *Japan Society of Obstetrics and Gynecology*. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00557-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00557-4)
- Sharp, A. J., Locke, D. P., McGrath, S. D., Cheng, Z., Bailey, J. A., Vallente, R. U., Pertz, L. M., Clark, R. A., Schwartz, S., Segraves, R., Oseroff, V. V., Albertson, D. G., Pinkel, D., & Eichler, E. E. (2005). Segmental Duplications and Copy-Number Variation in the Human Genome. *The American Journal of Human Genetics*, *77*(1), 78–88. <https://doi.org/10.1086/431652>
- Sharp, A., Robinson, D., & Jacobs, P. (2000). Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Human Genetics*, *107*(4), 343–349. <https://doi.org/10.1007/s004390000382>
- Shvetsova, E., Sofronova, A., Monajemi, R., Gagalova, K., Draisma, H. H. M., White, S. J., Santen, G. W. E., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Heijmans, B. T., van Meurs, J., Jansen, R., Franke, L., Kielbasa, S. M., den Dunnen, J. T., 't Hoen, P. A. C., Heijmans, B. T., 't Hoen, P. A., Boomsma, D. I., Pool, R., ... de Bakker, P. (2019). Skewed X-inactivation is common in the general female population. *European Journal of Human Genetics*, *27*(3), 455–465. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0291-3>
- Strobl, C., Eduardoff, M., Bus, M. M., Allen, M., & Parson, W. (2018). Evaluation of the precision ID whole MtDNA genome panel for forensic analyses. *Forensic Science International: Genetics*, *35*, 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.03.013>
- Tiberio, G. (1994). MZ female twins discordant for X-linked diseases: A review. *Acta Geneticae Medicae et Gemellologiae*, *43*(3–4), 207–214. <https://doi.org/10.1017/s0001566000001963>
- Turrina, S., Bortoletto, E., Giannini, G., & De Leo, D. (2021). Monozygotic twins: Identical or distinguishable for science and law? *Medicine, Science and the Law*, *61*(1_suppl), 62–66. <https://doi.org/10.1177/0025802420922335>
- Ueki, M., Takeshita, H., Fujihara, J., Kimura-Kataoka, K., Iida, R., & Yasuda, T. (2017). Simple screening method for copy number variations associated with physical features. *Legal Medicine*, *25*, 71–74. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2017.01.006>

- Vidaki, A., Kalamara, V., Carnero-Montoro, E., Spector, T. D., Bell, J. T., & Kayser, M. (2018). Investigating the epigenetic discrimination of identical twins using buccal swabs, saliva, and cigarette butts in the forensic setting. *Genes*, *9*(5).
<https://doi.org/10.3390/genes9050252>
- Wang, Z., Zhu, R., Zhang, S., Bian, Y., Lu, D., & Li, C. (2015). Differentiating between monozygotic twins through next-generation mitochondrial genome sequencing. *Analytical Biochemistry*, *490*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.08.024>
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., Galas, D. J., & Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*, *56*(11), 1733–1741. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>
- Weber-Lehmann, J., Schilling, E., Gradl, G., Richter, D. C., Wiehler, J., & Rolf, B. (2014). Finding the needle in the haystack: Differentiating “identical” twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. *Forensic Science International: Genetics*, *9*(1), 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.10.015>
- Wertheim, K. (2011). Fingerprint Sourcebook – Chapter 3: Embryology, physiology, and morphology of friction ridge skin. US Department of Justice Office of Justice Programs United States of America
- Wu, S., Kim, T. K., Wu, X., Scherler, K., Baxter, D., Wang, K., Krasnow, R. E., Reed, T., & Dai, J. (2016). Circulating MicroRNAs and Life Expectancy Among Identical Twins. *Annals of Human Genetics*, *80*(5), 247–256. <https://doi.org/10.1111/ahg.12160>
- Xiao, C., Pan, C., Liu, E., He, H., Liu, C., Huang, Y., Yi, S., & Huang, D. (2019). Differences of microRNA expression profiles between monozygotic twins’ blood samples. *Forensic Science International: Genetics*, *41*, 152–158.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.05.003>
- Xu, J., Fu, G., Yan, L., Craig, J. M., Zhang, X., Fu, L., Ma, C., Li, S., & Cong, B. (2015). LINE-1 DNA methylation: A potential forensic marker for discriminating monozygotic twins. *Forensic Science International: Genetics*, *19*, 136–145.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.07.014>
- Yuan, L., Chen, X., Liu, Z., Liu, Q., Song, A., Bao, G., Wei, G., Zhang, S., Lu, J., & Wu, Y. (2020). Identification of the perpetrator among identical twins using next-generation

- sequencing technology: A case report. *Forensic Science International: Genetics*, 44. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102167>
- Zhu, P., Guo, H., Ren, Y., Hou, Y., Dong, J., Li, R., Lian, Y., Fan, X., Hu, B., Gao, Y., Wang, X., Wei, Y., Liu, P., Yan, J., Ren, X., Yuan, P., Yuan, Y., Yan, Z., Wen, L., ... Tang, F. (2018). Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos. *Nature Genetics*, 50(1), 12–19. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0007-6>
- Zito, A., Davies, M. N., Tsai, P. C., Roberts, S., Andres-Ejarque, R., Nardone, S., Bell, J. T., Wong, C. C. Y., & Small, K. S. (2019). Heritability of skewed X-inactivation in female twins is tissue-specific and associated with age. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13340-w>
- Zody, M. C., Garber, M., Sharpe, T., Young, S. K., Rowen, L., O'Neill, K., Whittaker, C. A., Kamal, M., Chang, J. L., Cuomo, C. A., Dewar, K., FitzGerald, M. G., Kodira, C. D., Madan, A., Qin, S., Yang, X., Abbasi, N., Abouelleil, A., Arachchi, H. M., ... Nusbaum, C. (2006). Analysis of the DNA sequence and duplication history of human chromosome 15. *Nature*, 440(7084), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nature04601>
- Zubakov, D., Boersma, A. W. M., Choi, Y., van Kuijk, P. F., Wiemer, E. A. C., & Kayser, M. (2010). MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *International Journal of Legal Medicine*, 124(3), 217–226. <https://doi.org/10.1007/s00414-009-0402-3>
- Zubakov, D., Chamier-Ciemińska, J., Kokmeijer, I., Maciejewska, A., Martínez, P., Pawłowski, R., Haas, C., & Kayser, M. (2018). Introducing novel type of human DNA markers for forensic tissue identification: DNA copy number variation allows the detection of blood and semen. *Forensic Science International: Genetics*, 36, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.06.021>
- Zvyagin, I. V., Pogorelyy, M. V., Ivanova, M. E., Komech, E. A., Shugay, M., Bolotin, D. A., Shelenkov, A. A., Kurmosov, A. A., Staroverov, D. B., Chudakov, D. M., Lebedev, Y. B., & Mamedov, I. Z. (2014). Distinctive properties of identical twins' TCR repertoires revealed by high-throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(16), 5980–5985. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319389111>