

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Karolina Andreasová

Forenzní analýza epigenetických faktorů a mRNA
Forensic analysis of epigenetic factors and mRNA

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Halina Šimková

Praha, 2015

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, 12.5.2015

Podpis

Poděkování:

Především bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Halině Šimkové za trpělivost, ochotu a korekci při psaní mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, příteli a blízkému okolí za psychickou podporu a víru v mé úsilí, jehož výsledky se nacházejí na následujících stránkách.

Abstrakt:

V posledních letech se pozornost forenzní genetiky soustředí na výzkum epigenetických faktorů a mRNA. Ukázalo se totiž, že jejich analýza poskytuje velmi cenné informace, které je možné získat z malého množství biologické stopy a mezi něž patří např. odhadování okolností smrti, odhadování věku jedince, rozlišení monozygotických dvojčat, identifikace tkání a tělních tekutin, autentizace vzorku, určení paternální alely, apod. V této práci se pojednává o metodách analýz jednotlivých epigenetických faktorů a mRNA a jejich potenciálním uplatněním v budoucí forenzní praxi.

Klíčová slova:

epigenetické mechanismy, mRNA, forenzní genetik, forenzní analýza

Abstract:

In last years, forensic genetics focused on a research of epigenetic factors and mRNA. It turned out that their analysis provides valuable information that can be obtained from a small amount of a biological trace and which included e.g. estimation of circumstances of death, age estimation, discrimination within monozygotic twins, identification of tissues and body fluids, sample authentication, determination of paternal allele, etc. In this thesis, it is discussed methods of epigenetic factors and mRNA analysis and their potential application in future forensic practice.

Key words:

epigenetic mechanisms, mRNA, forensic genetics, forensic analysis

Obsah

1. Úvod	6
1.1 Epigenetika.....	6
1.2 Epigenetika a dědičnost.....	7
2. DNA metylace	7
2.1 DNA metylace a prostředí.....	8
2.2 Metody analýzy DNA metylace.....	9
2.2.1 Chemická modifikace cytosinových zbytků.....	9
2.2.2 Proteinová interakce s 5-methylcytosinem.....	9
2.2.3 Metylačně senzitivní restriktázy.....	9
2.2.4 Analýza DNA metylace - shrnutí.....	10
2.3 Aplikace ve forenzní genetice.....	10
3. miRNA	11
3.1 Uchovávání miRNA.....	11
3.2 Analýza miRNA profilu.....	11
3.2.1 Analýza pomocí microarrays	12
3.2.2 RNA -sekvenování.....	12
3.2.3 Kvantitativní reverzní transkripce PCR (qRT-PCR).....	12
3.3 Aplikace ve forenzní vědě.....	13
4. mRNA	14
4.1 Aplikace ve forenzní vědě.....	14
4.2 Analýza mRNA.....	15
5. Forenzní aplikace epigenetických faktorů	15
5.1 Identifikace tělních tekutin a tkání.....	15
5.2 Určení biologického stáří donora.....	18
5.3 Identifikace paternální alely	21
5.4 Autentizace vzorku.....	21
5.4.1 Autentizace vzorku - metody.....	22
5.4.2 In vitro syntéza DNA.....	23
5.4.2.1 PCR.....	23
5.4.2.2 Molekulární klonování.....	23
5.4.2.3 WGA.....	23

5.5 Rozlišení monozygotických dvojčat.....	24
5.6 Určení stáří biologické stopy.....	25
5.7 Další možné aplikace.....	26
6. Závěr.....	27
7. Použitá literatura.....	29

1. Úvod

Forenzní genetika je poměrně nová, rychle se rozvíjející vědní disciplína, jejíž znalosti se využívají zejména při objasňování kriminálních případů a v rámci občanskoprávních soudních sporů. Zavedené metody aplikované ve forenzní praxi využívají analýzu sekvence DNA, která je pro každého jedince na světě (s výjimkou monozygotických dvojčat) odlišná a specifická. DNA typing proto slouží jako doposud nejspolehlivější metoda identifikace vytipovaných osob, a uplatňuje se též jako vysoce spolehlivá metoda určování biologických příbuzenských vztahů. Analýza bodových polymorfismů (SNP) zase umožňuje s velkou přesností stanovovat parametry jako je biogeografický původ osoby či některé fenotypové znaky. Na určité typy otázek však analýza DNA odpovědět neumí.

V posledních několika letech byly publikovány některé nadějné studie, zabývající se epigenetickými faktory a mRNA a jejich uplatněním ve forenzní praxi. Epigenetické mechanismy a mRNA hrají roli v regulaci genové exprese, či přímo odrážejí její stav, jsou proměnlivé s věkem, vlivem okolního prostředí a v rámci určitého typu tkáně. Jejich analýza tak poskytuje velmi cenné informace, které z pouhé DNA sekvence vyčíst nelze. Mezi ně patří např. odhadování přibližného věku, okolností smrti a životního stylu jedince, identifikace tkání a tělních tekutin, informace o prodělaných chorobách, rozlišení monozygotických dvojčat, autentizace vzorku, určení paternální alely, apod.

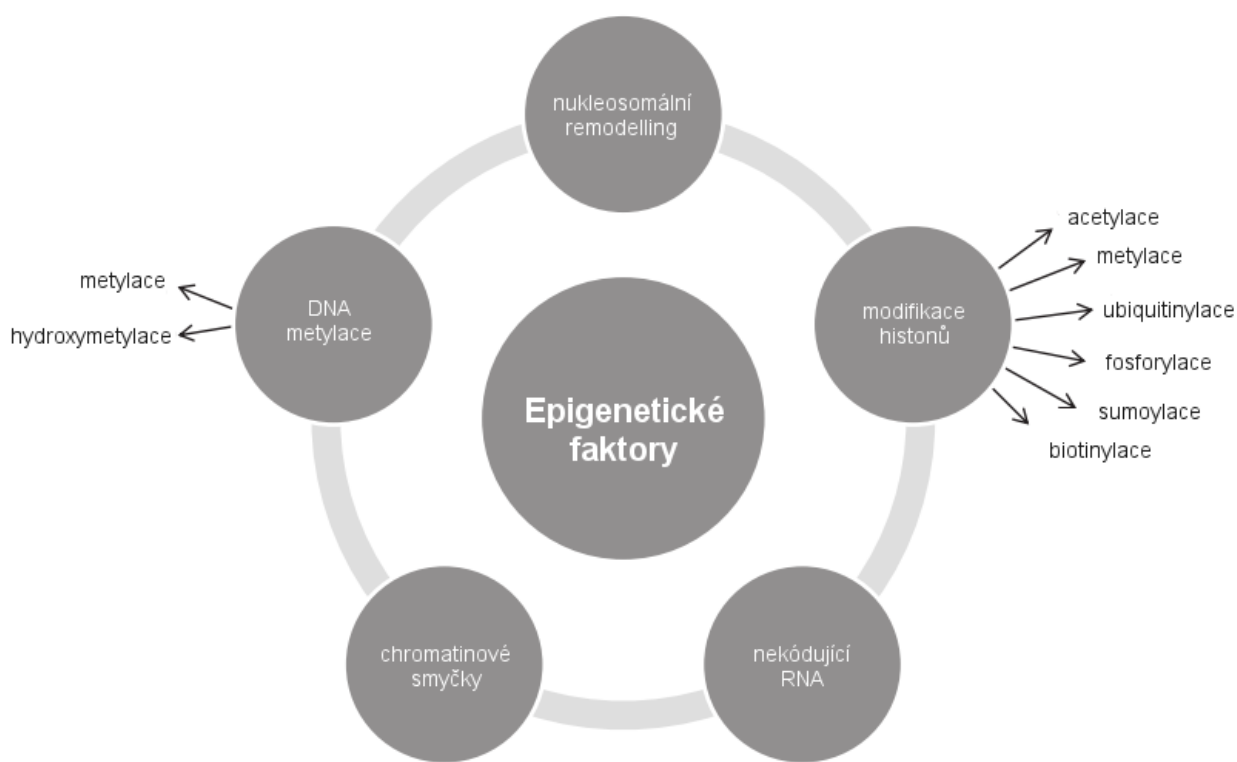
1.1 Epigenetika

Epigenetika je vědní obor zabývající se dědičnými modifikacemi DNA beze změny sekvence. K epigenetickým mechanismům patří zejména DNA metylace, modifikace histonů, regulace prostřednictvím nekódující RNA (miRNA), změny struktury chromatinových smyček a nukleosomální remodelling, jež všechny hrají důležitou roli v regulaci genové exprese, tedy snižují nebo zvyšují úroveň transkripce jednotlivých genů.

Epigenetické mechanismy (vyjma regulace genové exprese malými nekódujícími RNA) určitým způsobem modifikují strukturu DNA a/nebo histonů. V případě, že tyto modifikace znemožní přístup a navázání proteinů vázících se k DNA, transkripčních faktorů, RNA polymerázy II a dalších komponent transkripčního aparátu, umlčí tak přepis genetické informace. Takový dopad má zejména metylace DNA a histonů, ubiquitinylace, sumoylace a biotinylace histonů a některé změny typu chromatinových smyček. Pokud však epigenetické procesy mění strukturu

chromatinu (rozvolňují DNA) tak, aby byla lépe přístupná a došlo k navázání výše zmíněných proteinů, exprese daného genu stoupá. Zvýšení transkripce obecně zajišťuje acetylace, fosforylace a ubiquitinylace histonů, někdy však i metylace DNA, a zejména nukleosomální remodelling a změny struktury chromatinových smyček. (Bernstein et al., 2007)

Epigenetické vzorce se během buněčného dělení nemění, a tedy se dědí z generace na generaci. Během života jedince však mohou podléhat environmentálním vlivům a prodělávat změny vlivem různých faktorů, jako je výživa a celkový životní styl. (Bird, 2002)



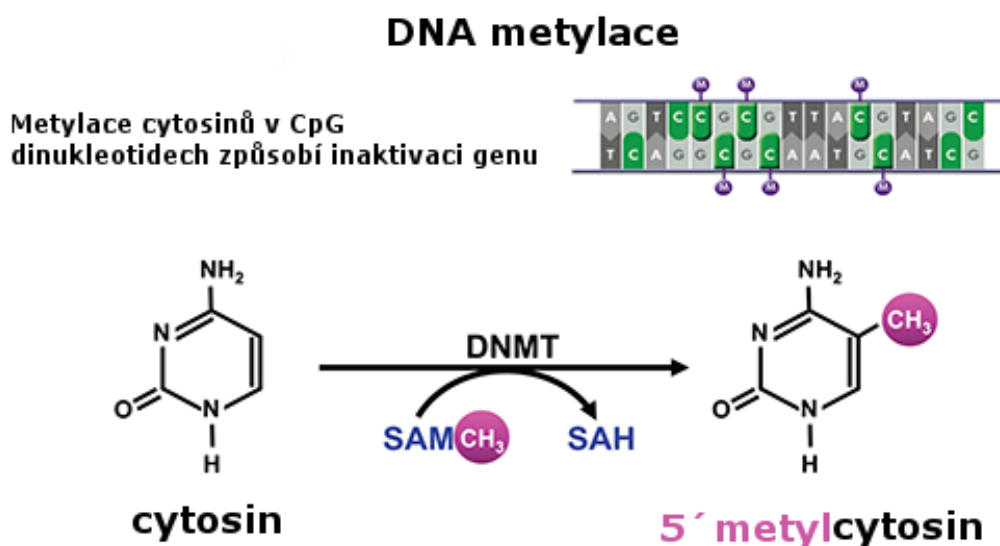
Obrázek č.1 - Epigenetické faktory. Převzato z (Vidaki et al.,2013), upraveno autorkou.

2. DNA metylace

DNA metylace je proces adice metylové skupiny (-CH₃) na pozici 5' nebo 4' uhlíku cytosinu zejména v CpG, ale též v CpA a CpT dinukleotidech; výjimečně dochází i k adici metylové skupiny na 6'C adenosinu. Metylce je katalyzována enzymy označovanými jako DNA

metyltransferázy (DNMT). Ve většině případů takto modifikované CpG v oblasti promotoru způsobí inaktivaci genu, řídce byly identifikovány případy, kdy je tomu i naopak.

V genomu savců je metylováno přibližně 60% - 90% dinukleotidů CpG. Nemetylované úseky CpG dinukleotidů jsou často nahloučené ve skupinách a tvoří tzv. „CpG ostrůvky“ o délce cca 300-3000 bp (Vidaki et al., 2013). V embryonálních buňkách nebyla metylace deoxyribonukleové kyseliny pozorována.



Obrázek č.2 - Metylace 5' uhlíku cytosinu pomocí DNMT. Metylovou skupinu přináší S-adenosyl metionin. (Zakhari, NIH)

2.1 DNA metylace a prostředí

DNA metylace je stupeň regulace mezi stálým genomem a dynamickým prostředím. Obecně platí, že se stárnutím a vlivem vnějšího prostředí dochází ke změně a zvyšování rozdílů míry metylace jednotlivých genů mezi jedinci. Nejlépe se tento fakt dá pozorovat na monozygotických dvojčatech, tedy jedincích s identickou výchozí genovou výbavou. Monozygotická dvojčata začínají se stejným genomem, ale postupem času můžeme sledovat rozdíly ve fenotypu, které jsou mimo jiné důkazem a důsledkem odlišné úrovně epigenetického profilu každého z nich.

U mnoha lidských onemocnění lze pozorovat odchylky v úrovni DNA metylace, a to jak hypometylací, tak hypermetylací. Například celogenomová hypometylace se typicky vyskytuje

v rakovinných buňkách a je pravděpodobně způsobena pasivní nebo aktivní ztrátou metylace DNA v průběhu opakovaných dělení a/nebo replikace.

2.2 Metody analýzy DNA metylace

K analýze DNA metylace jsou užívány tři základní metody, a to:

1. detekce chemicky modifikovaných nemetylovaných cytosinových zbytků
2. proteinová interakce
3. metylačně senzitivní restrikce

2.2.1. Chemická modifikace cytosinových zbytků

Tato metoda spočívá v modifikaci těch cytosinových zbytků, které nejsou metylované. K této modifikaci se používá NaHSO₃, který konvertuje nemetylované cytosiny na uracil, zatímco metylované cytosinové zbytky zůstanou beze změny.

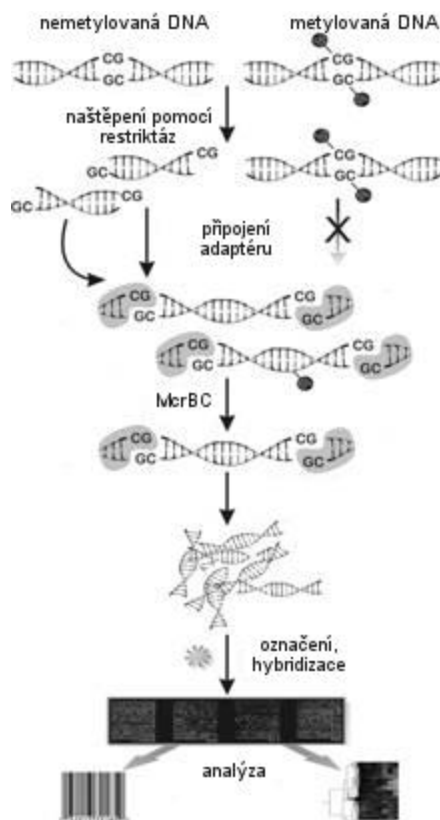
Při užití této metody nemusí dojít k úplné konverzi nemetylovaných cytosinových zbytků na uracil, což může při vyhodnocování výsledků vést k přecenění úrovně metylace.

2.2.2. Proteinová interakce s 5-metylcytosinem

Na rozdíl od předchozí metody, metoda proteinové interakce zachovává strukturu DNA bazí, postrádá však vysokou specifitu a citlivost. Většinou je založena na izolaci metylovaných částí DNA pomocí monoklonální protilátky 5-metylcytosinu. K izolaci fragmentů je DNA sonikována a denaturována.

2.2.3. Metylačně senzitivní restriktázy

Třetí užívanou metodou je štěpení DNA pomocí restriktáz (např. HpaII a Hin6I), jejichž aktivita závisí na metylaci CpG dinukleotidů v cílové sekvenci. Tyto restriktázní enzymy štěpí pouze nemetylované cytosinové zbytky, zatímco metylované CpG nechávají beze změny. Po kompletním naštěpení DNA ve vzorku se na jednotlivé fragmenty návaže specifický adaptér. Pokud i poté v těchto naštěpených krátkých oligonukleotidech zůstává metylovaná DNA, naštěpí a odstraní ji enzym McrBC (restriktáza, štěpící DNA v místě metylcytosinu, kterému předchází jeden z purinových nukleotidů). Finální fragmenty DNA s navázanými adaptéry se amplifikují pomocí PCR a analyzují (Schumacher, 2004-2007).



Obrázek č.3 - Analýza metylace DNA pomocí metylačně-senzitivních restričních enzymů.

Převzato z (Schumacher, 2004-2007), upraveno autorkou.

2.2.4 Analýza DNA metylace - shrnutí

Pro forenzní účely se jako nejvhodnější jeví analýza metylace DNA modifikací bazí pomocí hydrogensířičitanu (HSO_3^-), a to zejména kvůli jejím nízkým nárokům na kvantitu počáteční DNA. Jak ukazuje studie Xu et al., 2012, můžeme (při vhodné volbě izolační metody) touto bisulfitovou konverzí úspěšně analyzovat i vzorky tělních tekutin s obsahem DNA menším než 1 ng. Tento aspekt je velmi důležitý, neboť ve vzorcích, které se analyzují ve forenzní praxi, bývá DNA často velmi malého množství a nízké kvality.

2.3 Aplikace ve forenzní epigenetice

Všechny důležité procesy v buňce jsou regulovány expresí genů, a ta je zase regulována epigenetickými mechanismy. Epigenom se tedy mění na základě specifických buněčných potřeb.

Metylační profil DNA, stejně jako stav ostatních epigenetických faktorů, může odhalit aktivity jednotlivých genů určité tkáně v určité době, a být tak důležitým pomocníkem při určování patologického stavu (H'mida Ben-Brahim et al., 2015), typu samotné tkáně (Frumkin et al., 2011), či např. okolností vedoucích ke smrti (Fragou et al., 2011).

Analýzou DNA metylace je rovněž možné určit pohlaví a přibližný věk jedince, identifikovat paternální alelu či ověřit autenticitu (přírodní původ) DNA v biologické stopě. Tyto analýzy budou blíže popsány v kapitole 5.

3. MiRNA

Mikro-RNA je třída malých nekódujících RNA o délce 18-24 nukleotidů, které vznikají transkripcí DNA, ale nejsou dále translatovány, a které hrají podstatnou roli v regulaci genové exprese na posttranskripční úrovni. V buňce se miRNA vyskytuje vázána s proteinem Argonaut v komplexu RISC (RNA induced silencing complex), který se angažuje v procesu označovaném jako *RNA interference*. Při RNA interferenci dochází k navázání miRNA v komplexu RISC na 3' komplementární sekvenci UTR cílové mRNA, která je následně štěpena nebo destabilizována prostřednictvím zkrácení poly(A) konce. MiRNA tak snižuje translaci proteinu, který je danou mRNA kódován.

.

3.1 Uchovávání miRNA

V porovnání s mRNA, která v buňce velmi rychle degraduje, je miRNA v čase výrazně stabilnější. Svou stabilitu získává díky kooperaci s komplexem RISC (Winter and Diederichs, 2011), přesto po smrti jedince poměrně rychle degraduje. Bylo ověřeno, že po 10 dnech, kdy je lidské sérum vystaveno pokojové teplotě, její koncentrace ve vzorku rapidně klesá, nicméně stále zůstává detekovatelná. (Silva et al., 2015)

Uchovávat miRNA v dobrém stavu lze ve vysušených vzorcích (nezbytné je však kompletní vysušení), v lidském séru může být její životnost prodloužena zmrazením na -20°C až -80°C, přičemž rozmrazení a znovuzmrazení její stabilitu výrazně snižuje. (Silva et al., 2015)

3.2 Analýza miRNA profilu

Analýzovat stav miRNA ve vzorku lze celou řadou metod. Mezi nejefektivnější a nejpoužívanější patří:

1. Analýza pomocí microarrays
2. RNA sekvenování
3. Kvantitativní reverzní transkripce PCR (qRT-PCR)

Všechny zmíněné metody pracují s cDNA (complementary DNA), která vznikne reverzní transkripcí analyzovaných miRNA. Protože miRNA jsou velmi krátké a nesdílejí žádnou sekvenci tak, aby mohl být využit pouze jeden univerzální primer, je relativně obtížné tuto reverzní transkripci uskutečnit. Proto jsou zpravidla užívány specifické miRNA primery (lineární nebo s vlásenkou), pomocí kterých je reverzně transkribována vždy jen konkrétní miRNA. Druhou možností je prodloužení vlákna RNA připojením fragmentu známé sekvence a následné použití primeru universálního (Benes and Castoldi, 2010).

3.2.1 Analýza pomocí microarrays

Metoda spočívá v hybridizaci fluorescenčně označené cDNA s na čipu vázanou sondou známé sekvence. Míra výsledné fluorescence odráží množství hybridizovaných fragmentů.

Microarray technologie umožňuje sledovat současně přítomnost mnoha set různých miRNA a současně je poměrně levná. Výsledky však může negativně ovlivnit nízká specifita a citlivost metody. Hlavní nevýhodou ve forenzním kontextu je potřeba relativně velkého množství vzorku.

3.2.2 RNA-sekvenování

Metoda pracuje s cDNA ve formě krátkých úseků, na které se naváží specifické adaptory (k jednomu či k oběma koncům fragmentu) a tyto fragmenty jsou poté sekvenovány. Obvyklá délka získané sekvence je 30-400bp. (Wang et al., 2009)

Metoda je velmi efektivní především proto, že jí lze analyzovat jak známé, tak i nové, dosud neobjevené miRNA. Zároveň je schopna zachytit i jednonukleotidový rozdíl mezi dvěma miRNA. Nevýhodou metody je její poměrně vysoká cena, potřeba velkého množství bioinformatických nástrojů k analýze sekvenčních dat a nemožnost stanovit celkové množství miRNA.

3.2.3 Kvantitativní reverzní transkripce PCR (qRT-PCR)

Metoda amplifikuje vzniklou cDNA pomocí kvantitativní PCR. Jednotlivé miRNA se vzájemně někdy i značně liší počtem obsažených CG párů, a v důsledku toho teplotou tání (T_m) dsDNA při vazbě s komplementárním specifickým miRNA primerem, což může způsobovat problém při navrhování PCR. Pokud je rozdíl T_m vysoký, lze ho snížit zkrácením sekvence primeru. Pokud je rozdíl T_m malý, lze problém korigovat navázáním tzv. LNAs (locked nucleic acids), což jsou syntetizované RNA/DNA sekvence, komplementární k cDNA. Každá použitá LNA zvýší termostabilitu DNA/DNA hybridu o 5°C . (Benes and Castoldi, 2010)

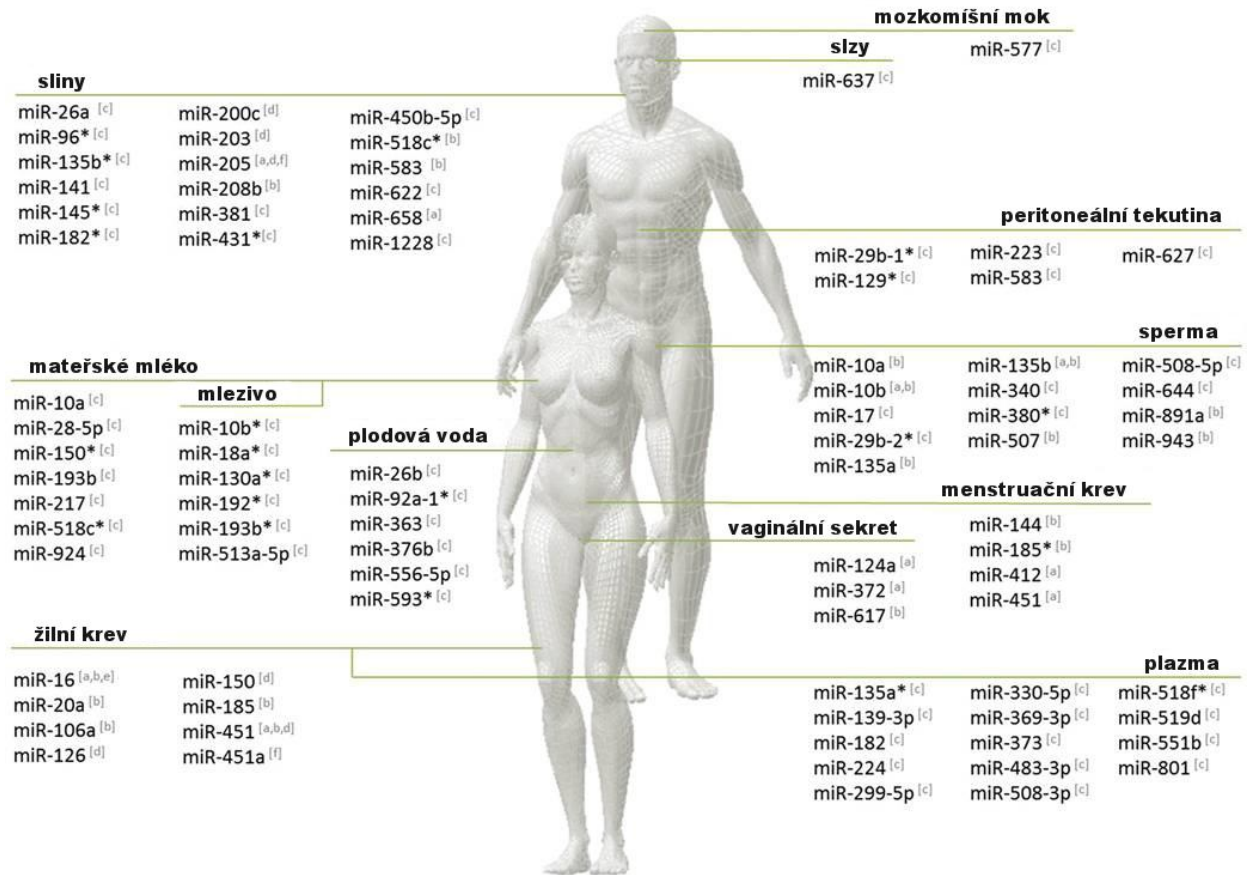
QRT-PCR je v porovnání s předchozími dvěma metodami velmi sensitivní a specifická. Navíc umožňuje absolutní kvantifikaci miRNA ve vzorku, nevyžaduje velké vstupní množství vzorku a je poměrně levná. Metoda však nedokáže analyzovat nové miRNA.

3.3 Aplikace ve forenzní vědě

Forenzní význam malých nekódujících RNA spočívá v jejich specifičnosti pro konkrétní typ tkáně (Silva et al., 2015). Díky tomu se mohou stát miRNA dobrým biomarkerem, pomocí kterého lze identifikovat původ a typ tělních tekutin, jejichž stopy se často vyskytují na místě činu (krev, sliny, vaginální sekret, sperma); tyto informace z pouhé sekvence DNA přítomné ve vzorku určit nelze.

Výběr spolehlivých a validních biomarkerů v podobě miRNA bohužel není jednoduchý a recentní studie vykazují jisté neshody. Např. miR-205 byla v jedné studii určena jako biomarker pro sliny (Courts et al., 2011), v druhé studii jako biomarker epitelní tkáně (Wang et al., 2012). Přehled doposud identifikovaných potenciálních biomarkerů v podobě miRNA je uveden na obrázku č.4. Zajímavou skutečností je, že doposud nebyla nalezena miRNA specifická pro moč. (Weber et al., 2010)

Mimo identifikaci tělních tekutin může miRNA sloužit také k určení věku, pohlaví a patologických stavů jedince. O těchto postupech je blíže pojednáno v kapitole 5.



Obrázek č.4 - Přehled miRNA, které jsou potenciálními biomarkery pro uvedené tkáně. Převzato z (Silva et al.,2015), upraveno autorkou.

4. mRNA

MRNA, neboli messengerová RNA, je jednořetězcová ribonukleová kyselina s informační funkcí. Přenáší genetickou informaci obsaženou v DNA do proteinu skrze translaci, tedy slouží jako matrice pro syntézu určité bílkoviny. Messengerová RNA vzniká procesem zvaným transkripce, kdy je syntetizována RNA polymerázou na základě sekvence exonu genu v DNA. Její množství v buňce závisí na konkrétních specifických potřebách buňky, které ovlivňuje jak vnější prostředí, patologický stav, tak kupříkladu i potřeba diferenciací v určitou tkáň apod.

4.1 Aplikace ve forenzní vědě

Stejně jako tkáňově specifické miRNA a DNA metylace, je i mRNA vhodným markerem pro identifikaci tělních tekutin obvykle se vyskytujících na místě činu. Profilování mRNA je doposud nejspolehlivější metodou, neboť v porovnání s epigenetickými markery, jejichž studium

je teprve v počátcích, je mRNA prostudována dostatečně a známe řadu vysoce specifických a citlivých biomarkerů povahy mRNA, které lze aplikovat v praxi. Navíc i přesto, že je mRNA za běžných fyziologických podmínek v buňce málo stabilní (poločas života v řádech minut až hodin), je možné úspěšně izolovat RNA i ze vzorků starých několik let. Ve studii Kohlmeiera a Schneidera (Kohlmeier and Schneider, 2012) se podařilo analyzovat mRNA (konkrétně HBB marker) ve stopách krve vystavených po dobu 23 let určitým vnějším podmínkám (pokojová teplota, sucho a tma). Skutečnost, že některé mRNA markery jsou takto stabilní, z nich dělá další účinný nástroj forenzní praxe.

Lze uvažovat i o provádění analýzy mRNA u znovuotevřených případů, což by přineslo možnost odhalit skutečnosti, které nebylo možné před určitou dobou pomocí analýzy DNA zjistit. Bohužel, často jsou namísto celých stop deponovány pouze vzorky DNA a není jisté, zda by se v nich dala detekovat i RNA. Míra koizolace DNA/RNA závisí totiž výrazně na použité metodě extrakce. (Lindenbergh et al., 2012)

4.2 Analýza mRNA

Hlavní metodologickou výhodou profilování mRNA je její koextrakce s DNA, kdy nedochází ke ztrátě materiálu, a dále možnost detekovat hned několik tělních tekutin během jediné analýzy pomocí multiplexové PCR, čímž jsou simultánně získány informace o expresi více než jednoho genu.

Běžným postupem profilování mRNA je nejprve lýza buněk, poté koextrakce DNA/RNA ze vzorku, separace DNA, reverzní transkripce mRNA do cDNA, amplifikace cDNA pomocí multiplexové PCR, analýza fragmentů kapilární elektroforézou s detekcí laserem indukované fluorescence a závěrečné vyhodnocení získaných dat, tedy určení typu biologické stopy. (Juusola et al., 2005)

5. Forenzní aplikace analýzy epigenetických faktorů

5.1 Identifikace tělních tekutin

Identifikace tělních tekutin je ve forenzní praxi velmi významná, neboť poskytuje vodítko ke zjištění okolností posuzovaného případu (například nalezení spermatu na místě činu může poukazovat na sexuální útok). Základní forenzně biologické metody identifikace, jako je enzymatická, imunologická, či chemická analýza, byly a jsou běžně používány, avšak mohou

za určitých okolností poskytovat nepřesné informace kvůli nespecifické reakci s jinými látkami přítomnými ve vzorku.

Určit původ biologických stop můžeme jak analýzou DNA metylace, detekcí přítomnosti specifických miRNA, tak i analýzou mRNA.

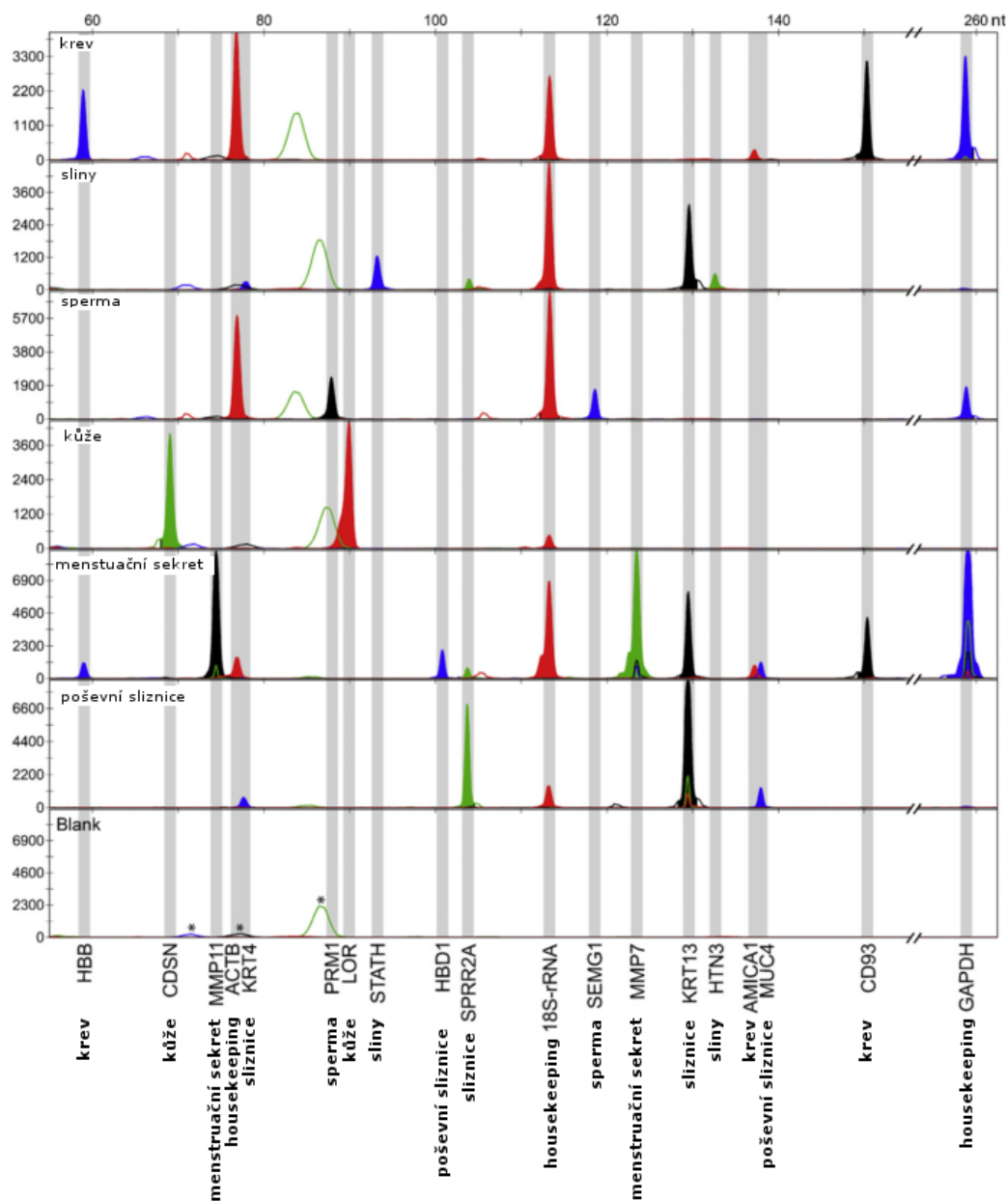
V případě analýzy DNA byly testovány určité genetické lokusy, které se v jednotlivých tkáních liší svou úrovní metylace. Několika studii byly identifikovány takové markery, které jednotlivé tělní tekutiny odlišují od ostatních, a to: C20orf117, cg06379435, cg08792630 pro krev; BCAS4, cg26107890, cg20691722 pro sliny; ZC3H2D, FGF7, DACT1, USP49, cg23521140, cg17610929 pro sperma; PFN3 a PRMT2, cg01774894, cg14991487 pro vaginální sekret (Park et al., 2014),(An et al., 2013),(Madi et al., 2012). Zpravidla lze od ostatních tělních tekutin snadno odlišit ejakulát. Naopak rozdíly v DNA metylaci stávajících markerů pro sliny a vaginální sekret nejsou k jejich bezpečnému odlišení dostačující, a je proto potřeba dalších studií v tomto směru. (Park et al., 2014)

K identifikaci vaginálního sekretu se též užívají mikrobiální testy, které detekují přítomnost bakterie rodu *Lactobacillus*, charakterizující vaginální mikroflóru. Nevýhodou je skutečnost, že tyto bakterie, vyskytující se přirozeně v pochvě, se mohou přenést na ruce, penis a jiné části lidského těla, které jsou s ženským genitálem v kontaktu, a narušit tak přesnost výsledků. (Fleming and Harbison, 2010)

Další možností, jak identifikovat lidskou tkáň či tělní tekutinu, je analýza malých nekódujících miRNA. Zdá se, že pro každou forenzně zajímavou tkáň již bylo nalezeno dostatek potenciálních miRNA biomarkerů (viz obrázek č.4). Nicméně – jak už bylo konstatováno výše – studie, které se hledáním těchto biomarkerů zabývaly, se někdy rozcházely ve svých závěrech (např. v jedné studii určitá miRNA definovala epitelální tkáň, v druhé sliny). Bude proto potřeba problematiku dále studovat, aby byly nalezeny spolehlivé markery specifické pouze pro jednu danou tělní tekutinu či tkáň. (Silva et al., 2015)

V tuto chvíli je nejefektivnější metodou identifikace tělních tekutin a tkání analýza mRNA. Její výhodou je možnost simultánního namnožení více než jednoho mRNA markeru v jednom kroku pomocí multiplexové PCR, což ušetří mnoho času. Byly identifikovány genomové lokusy, které jsou v určitých tkáních silně transkribovány do mRNA, a jsou tedy pro tuto tkáň specifické. Na obrázku č.5 je elektroforetogram jednotlivých markerů v testovaných vzorcích pro krev, sliny, poševní sliznici, sliznici (obecně), sperma, menstruační sekret a vybrané housekeeping

geny (provozní geny v eukaryotické buňce, které jsou exprimovány ve všech typech buněk a ve všech vývojových stádiích). Lze však říct, že z uvedených tří způsobů identifikace tělních tekutin má pravděpodobně největší budoucnost identifikace pomocí analýzy DNA metylace. DNA je totiž méně náchylná k degradaci než RNA. Je ale opět potřeba dalších studií, aby se — jak už bylo zmíněno — našlo více spolehlivých markerů, a to zejména pro rozlišení slin a poševní sliznice.



Obrázek č.5 - Elektroforetogram (výsledek 19-plex PCR) výskytu jednotlivých mRNA markerů v daných tkáních a tělních tekutinách. Jednotlivé píky představují pozitivní signál, tedy přítomnost daného markeru ve vzorku. Převzato z (Lindenbergh et al., 2012), upraveno autorkou.

5.2 Určení biologického stáří donora

Z hlediska získání informací důležitých pro postup vyšetřování je velmi důležitým cílem analýzy biologického materiálu predikce věku donora, která může podstatně zmenšit okruh vytipovaných osob. Zde je v prvé řadě nutné upozornit na rozdíl mezi věkem biologickým a kalendářním, protože z biologického materiálu člověka lze určit pouze věk biologický, na jehož základě se odhaduje věk kalendářní. Kalendářní věk je doba uplynulá od narození. Biologický věk je stav fyzického těla, odrážející vývojový stupeň, výkon a zdraví orgánů a tkání. Závisí na životním stylu jedince, prodělaných chorobách a genetických faktorech, přičemž špatný vliv na něj mají nezdravé stravovací návyky, kouření, užívání alkoholu a jiných drog, nedostatek pohybu, apod. Může se tak stát, že se biologický věk mladého člověka vyrovná biologickému věku člověka ve středních letech, který žije o mnoho zdravěji. (Roizen a Stephensonová, 2000) Tento fakt je při odhadování věku nutné zohlednit.

V současnosti se biologické stáří určuje zejména u lidských ostatků, a to na základě měření a analýzy vybraných oseálních a dentálních znaků, popřípadě i měkkých tkání, pokud ještě nedošlo k jejich rozkladu. Podmínkou je tedy nalezení těla, kostry a/nebo chrupu v co nejlépe zachovaném stavu, což v běžné praxi není vždy pravidlem. Navíc predikce věku na základě kosterních markantů není vysoce přesná, věk lze odhadovat pouze v relativně širokém intervalu (někdy je tento interval až 20-40let). Je tedy vhodné najít i jiné, přesnější metody určování kalendářního věku člověka.

Protože se stáří projevuje nejen somatickými znaky, ale i na molekulární úrovni, je teoreticky možné predikovat věk na základě jistých molekulárních změn projevujících se s postupem času a života jedince. Mezi ně patří zejména degradace DNA, vyšší počet chyb při replikaci, zkracování telomer a změny globální úrovně metylace. Obecně platí, že se úroveň metylace genomových lokusů stárnutím snižuje spolu s funkcí DNMT1. (Jr et al., 2003) Existují však i takové geny, jejichž promotory se se zvyšujícím věkem hypermetylují, např. supresory nádorů a další geny svou funkcí spojené s nádory, což ve výsledku násobí riziko propuknutí rakovinného bujení. (So et al., 2006) Nalezení dostatečného množství genomových lokusů, jejichž úroveň

metylace vysoce koreluje s věkem (pozitivně či negativně) a přitom není individuálně proměnlivá, by mohlo být potenciální nadějí na zefektivnění určování kalendářního věku.

Ve studii (Yi et al., 2014) bylo pomocí metody MS-RDA z krevních vzorků nalezeno a identifikováno 8 markerů, které byly odlišně metylovány u donorů mladého věku (10-15 let) a u donorů staršího věku (65-70 let). Všechny tyto markery vykazovaly vysokou korelaci s věkem a naopak nevykazovaly interindividuální rozdíly. Geny, jež je charakterizují, hrají roli ve vývojových procesech buňky. V tabulce č.1 je uveden jejich přehled, lokalizace a dodatečné informace.

Gen	Lokace	Oblast promotoru	CpG ostrůvek	Počet CpG	délka
TBOX3	12q24.1	ne	ne	15	224
GPR137	11q22.3	ne	ne	9	216
ZIC4	3q24	ne	ano	11	141
ZDHHC22	14q24.3	ne	ano	19	312
MEIS1	2p14	ne	ne	21	306
UBE2E1	3p24.2	ne	ano	15	292
PTDSS2	11p15.5	ano	ano	24	283
UBQLN1	9q22	ano	ano	10	149

Tabulka č.1 - seznam 8 markerů (genů) identifikovaných metodou MS-RDA. Převzato z (Yi et al., 2014), upraveno autorkou.

V další studii (Zbiec-Piekarska et al., 2015) byla prověřena a porovnána úroveň metylace 7 CpG lokusů v promotoru ELOVL2 ve vzorcích krve donorů ve věku od 2 do 75 let. Bisulfátovou konverzí cytosinů a následným pyrosekvenováním bylo zjištěno, že nejvyšší korelaci s věkem vykazuje místo označené jako C7. Finální testovaný model, skládající se ze dvou CpG míst ELOVL2 promotoru, se shodoval s věkem kalendářním s průměrnou chybou 6,8 let.

Dále byl navrhnout model, který je schopen predikovat chronologický věk člověka v rozmezí 18-70 let s průměrnou přesností 5,2 let. Jedná se o analýzu metylace dvou cytosinů z EDARADD, TOM1L1 a NPTX2 genů ve slinách člověka (Bocklandt et al., 2011), lineární korelace s věkem byla však u těchto markerů potvrzena i v krvi testovaných donorů. (Rakyan et al., 2010)

Jak je popsáno výše, na základě odlišné úrovně metylace určitých lokusů v genomu člověka lze poměrně přesně predikovat jeho chronologický věk. Hledáním nových CpG míst, které vysoce pozitivně či negativně korelují s věkem a ověřením jejich spolehlivosti by se mohla predikce věku člověka do budoucna výrazně zefektivnit.

5.3 Identifikace paternální alely

Při určování otcovství se recentní metody soustředí na analýzu DNA, konkrétně detekci shodné alely v genomu dítěte a testovaných domnělých otců. Tento obligatorní gen můžeme identifikovat z genomu dítěte, pouze pokud je znám genotyp matky a dítě přitom s matkou nesdílí identický heterozygotický pár alel. V ostatních případech prozatím neexistuje metoda schopná rozlišit paternální původ alely. (Vidaki et al., 2013)

Člověk má všechny své autozomální geny ve dvou kopiích, přičemž jednu zdědil od otce a druhou od matky. Ve většině případů jsou exprimovány obě dvě verze genu, u určitých genů však je jedna alela cíleně vypnuta a exprimována je pouze mateřská či naopak otcovská alela. Tento mechanismus regulace genové exprese se nazývá *genový imprinting* a je realizován zejména metylací jedné z alel. Pokud je tedy analyzován stav metylace imprintingovaných genů, je možné zjistit, která alela je otcovského původu a na základě této informace dále vyloučit domnělého otce, který tuto alelu nevlastní.

Určit paternální původ alely analýzou metylace lze např. na imprintingovaném SNP lokusu rs220028 (Zhao et al., 2005), dále analýzou H19 genu (exprimuje se pouze mateřská alela), HYMA1, SNRPN a PEG3 genu (exprimuje se pouze otcovská alela) v periferní krvi. (Nakayashiki et al., 2008) Ukázalo se však, že úroveň metylace CpG míst těchto genů v některých testovaných tkáních (nehty, vlasy a spermie), či vlivem dlouhodobého skladování a vysokých teplot, vykazují neočekávané fluktuační. (Nakayashiki et al., 2009) Je tedy potřebné se nadále zabývat závislostí DNA metylace na typu tkáně a vnějších podmínkách, aby bylo možné identifikovat paternální alelu ze všech forenzně důležitých tkání lidského těla a za variabilních podmínek.

5.4 Autentizace vzorku

Moderní technologie umožňuje jen se základními znalostmi molekulární biologie a patřičnými technickými nástroji uměle vytvořit syntetický fragment DNA, shodný s určitým úsekem DNA

libovolného existujícího jedince. Tento fakt s sebou přináší riziko podvržení syntetické DNA pachatelem, což může vést ke zmatení či přímo nesprávné identifikaci donora ze vzorků odebraných na místě činu. Je proto potřeba mít k dispozici analýzu, jejímž prostřednictvím lze rozlišit přírodní *in vivo* syntetizovanou DNA, pocházející z buněk, od arteficiální DNA, syntetizované *in vitro* v laboratoři.

Běžný postup ve forenzní praxi začíná sběrem vzorků biologických stop z místa činu, pokračuje extrakcí DNA a její amplifikací pomocí PCR a končí profilováním standardního souboru cca 9-21 STR (short tandem repeat) lokusů, které jsou vysoce polymorfnní a pro každého člověka specifické. Tyto STR se poté srovnávají s obdobným profilem, získaným analýzou DNA podezřelých osob. Pokud jsou profily shodné, je zpravidla (s výjimkou monozygotických dvojčat) překročena hranice individuální identifikace a osobu lze považovat za spolehlivě identifikovanou.

Při řešení kriminalistických případů se prozatím nezohledňuje fakt, že lze DNA falšovat a vnést na místo činu s úmyslem zastřít vlastní biologické stopy či přímo svést podezření na cizí osobu. Je tedy nutné zavést do běžné praxe metody, které by mohly tomuto riziku zabránit. Jedním ze způsobů odlišení *in vitro* a *in vivo* syntetizované DNA je analýza metylace určitých genomových lokusů. Přírodní DNA totiž obsahuje jak metylované, tak i nemetylované lokusy, kdežto uměle vytvořená DNA není metylována vůbec. (Frumkin et al., 2010) Analýza metylace se provádí metodami popsány v kapitole 2.2.

5.4.1 Autentizace vzorku - metody

Studie (Frumkin et al., 2010) navrhla a ověřila postup, jak autentizovat vzorek DNA. Tento rozbor začíná bisulfátovou konverzí všech nemetylovaných cytosinů na uracil. Poté se amplifikují čtyři lokusy (NT18, ADD6, MS53, SW14) a jeden referenční CODIS STR lokus (FGA) pomocí PCR. NT18 a ADD6 lokusy byly vybrány, protože jsou konzistentně metylovány a naopak MS53 a SW14 byly vybrány, protože metylovány nejsou (v lidských slinách, krvi a epitelní tkáni). Namnožené amplikony se analyzují pomocí elektroforézy. Pokud chybí kompletně všechny amplikony, nastala chyba v procesu. Pokud se úspěšně amplifikuje CODIS lokus FGA, ale zbývající lokusy zůstanou nedotčeny, obsahuje testovaný vzorek uměle syntetizovanou DNA, která se vytvořila v procesu generujícím pouze určité úseky DNA, tedy pomocí PCR či molekulárního klonování. Amplifikace všech lokusů říká, že v testovaném

vzorku je buď umělá DNA (vytvořená metodou WGA), nebo čistě přírodní DNA. Rozlišit mezi těmito dvěma typy DNA lze pomocí sekvenování a analýzy úrovně metylace. Pokud je testovaný vzorek metylován tak, jak bylo popsáno výše (metylované cytosiny v NT18 a ADD6 loci a nemetylované cytosiny MS53 a SW14 loci), jedná se o *in vivo* syntetizovanou DNA, v ostatních případech se jedná o DNA syntetizovanou *in vitro*.

5.4.2 In vitro syntéza DNA

Vytvořit umělou DNA lze pomocí PCR, molekulárního klonování, či WGA (whole genom amplification).

5.4.2.1 PCR

Metodou PCR lze pomocí primerů amplifikovat vybranou sekvenci DNA do požadovaného množství. Je také možné namnožit více míst najednou, například těch, o kterých je známo, že budou testovány kriminalistickou laboratoří.

5.4.2.2 Molekulární klonování

Molekulární klonování spočívá v namnožení požadované sekvence DNA pomocí mikroorganismů — nejčastěji bakterií, bakteriofágů a kvasinek. Nejprve se vytvoří vhodný vektor, obsahující sekvenci, kterou chceme naklonovat, a vloží se do hostitelského organismu. Ten vektor přijme jako svou vlastní DNA a v průběhu několika buněčných cyklů ji namnoží na požadované množství. (Holasová et al., 2006) Pro tuto metodu není potřeba vstupní přírodní DNA, k vytvoření vektoru stačí pouze znalost požadovaných sekvencí, principálně tedy kupříkladu genetického profilu získaného z databáze .

5.4.2.3 WGA

Cílem této metody je získat genomovou DNA (gDNA) ve velkém množství (řádově mg) i z malého původního vzorku (ng). Na rozdíl od klasické PCR, která amplifikuje pouze určité vybrané sekvence, WGA amplifikuje celý genom. K tomuto účelu používá různé typy primerů – takové, které jsou komplementární k často se vyskytujícím sekvencím v genomu, dále zcela náhodné primery a naopak relativně specifické primery. WGA získává gDNA pomocí izotermální amplifikace. (Šušla, n.d.)

5.5 Rozlišení monozygotických dvojčat

V případě identifikace osob či určování paternity, selhávají u monozygotických dvojčat standardní metody forenzní analýzy. Identifikace jedince na základě profilování vysoce polymorfních STR lokusů nemůže u monozygotických dvojčat fungovat, neboť jejich STR lokusy jsou s vysokou pravděpodobností shodné. Protože tato dvojčata se rodí s poměrně vysokou četností — cca 3/1000 (Bortolus et al., 1999), zvyšuje se pravděpodobnost výskytu případů vyžadující jejich rozlišení. Je tedy důležité najít metody, které by toho byly schopny.

Monozygotická dvojčata pocházejí z jedné zygoty, a je tedy předpoklad, že sdílejí identickou genovou výbavu. Fakt, že jsou některá dvojčata fenotypově různá, se vysvětluje především odlišnými epigenetickými profily, konkrétně rozdílným profilem metylace cytosinů v CpG dinukleotidech (Li et al., 2011) a profilem acetylace histonů. Tyto rozdíly se zvyšují s věkem a mění se vlivem vnějších podmínek. (Fraga et al., 2005)

Nedávné studie však potvrzují, že se monozygotická dvojčata mohou lišit i sekvencí DNA. Od chvíle rozdělení embrya totiž může dojít k *de novo* mutacím na úrovni pouhého jednoho nukleotidu, které pak nese v genomu pouze jedno z dvojčat. Taková místa se obecně nazývají SNP (single nucleotide polymorphism) a detekce jejich rozdílů mezi oběma monozygotickými dvojčaty může vést k rozlišení těchto dvojčat. Navíc, pokud tyto mutace vzniknou krátce po rozdělení blastocysty, objeví se odlišný SNP jak v tělních, tak i zárodečných buňkách a je dědičný, přičemž existuje více než 3,7 % pravděpodobnost, že se takováto mutace v genomu vyskytne. (Weber-Lehmann et al., 2014) (Krawczak et al., 2012)

Ve studii (Weber-Lehmann et al., 2014) analyzovali její autoři pomocí NGS (next generation sequencing) metod DNA jednoho páru monozygotických dvojčat (mužů), extrahovanou z jejich spermatu, krve i buňkách stěrných. Pro srovnání a určení paternity touto metodou sekvenovali také DNA dítěte jednoho z dvojčat a matku tohoto dítěte. Objevili pět SNP, které se nacházely pouze u dítěte a jednoho z dvojčat. Podařilo se jim tedy nejen rozlišit obě monozygotická dvojčata, ale také po srovnání s genomem dítěte určit, kdo z dvojčat je jeho biologickým otcem. Jinou studií bylo zjištěno, že se monozygotická dvojčata mohou lišit i na bázi CNV (copy number variaton), tedy abnormálních počtů kopií určitých lokusů tedy drobných delecí nebo duplikací. (Erickson et al., 2008)

Nelze tedy tvrdit, že jsou monozygotická dvojčata co do DNA sekvence zcela identická, neboť mezi nimi existují i rozdíly genetického rázu, ačkoliv se může jednat o pouhý jeden

mutovaný nukleotid. K detekci takovýchto drobných rozdílů je nutné použít velmi precizní a detailní metody sekvenování celého genomu, např. *NGS*. S jejich rozvojem se nabízí možnost znovuošetření případů s monozygotickými dvojčaty, které nebyly v minulosti vyřešeny.

5.6 Určení stáří biologické stopy

Určení stáří biologické stopy nalezené na místě činu napomáhá určit dobu, kdy došlo k danému incidentu. V případě, že je doba, kdy se kriminalistická událost stala, známa, určení stáří stopy z místa činu může vyloučit nebo potvrdit souvislost stopy s daným skutkem. Takové informace jsou ve forenzní praxi velmi žádoucí. Velmi intenzivně se například pracuje na metodě, která by jednoduše a přesně určila PMI (post mortem interval), tedy čas uplynulý od okamžiku smrti. V současné praxi se využívá znalostí patofyziologie, entomologie, biologie a biochemie, jejichž výsledky však nejsou přesné a spolehlivé, neboť mohou být ovlivněny nejrůznějšími vnějšími faktory (teplota, vlhkost, místo nalezení těla,..).

Aby bylo možné určit PMI přesně, je nutné hodnotit takový parametr, který se konstantně mění s časem uplynulým od chvíle smrti. Tyto podmínky ve většině případů splňuje degradace nukleových kyselin, tedy RNA a DNA. Nukleové kyseliny jsou po smrti postupně degradovány nukleázami přítomnými v buňce, či pocházejícími z bakterií a okolního prostředí. Ve studii (Miki et al., 2011) autoři prokázali, že lze efektivně určovat PMI z poměru analyzovaného množství namnožené sekvence *Rsrc 1* genu v játrech ku množství této sekvence DNA nalezené ve tkáni mozku, kdy obě tkáně byly po smrti jedince vystaveny chladnému počasí okolo 4°C. Obsah intaktní DNA v čase klesá a s tím i množství analyzované sekvence *Rsrc 1* genu. U vyšší teploty již tento poměr játra/mozek konstantně neklesal a není tedy pro další účely zajímavý. Téměř lineární závislost na čase vykazovalo i množství degradované DNA z tkáně mozku vystavené 20°C a DNA z ledvin vystavených teplotě 4°C. Nukleové kyseliny z mozkových buněk obecně vykazují vyšší stabilitu než z jiných tkání, a jsou tedy vhodné pro analýzu při delším očekávaném časovém post mortem intervalu. (Bauer et al., 2003a)(Miki et al., 2011)

Alternativním způsobem, jak určit PMI, je analýza degradované RNA v nalezené stopě. Cílem je najít tkové univerzální RNA, které se nachází ve všech tkáních člověka a *ex vivo* nezávisle na vnějším prostředí kontinuálně degradují. Tak by bylo možné spolehlivě určit stáří biologické stopy, ať už má jakýkoliv původ a je vystavena libovolným podmínkám.

Ve studii (Sampaio-Silva et al., 2013) se autoři zabývali vztahem PMI a degradace RNA v útrobních orgánech a svalech laboratorní myši. Celkově analyzovali stav RNA transkribovaných z 11 genů v jejích tkáních (evolučně konzervované — *Rps29* a *Srp72*; nejvíce přepisované geny v játrech — *Bhmt* a *Alb*; nejvíce přepisované geny srdečního a čtyřhlavého stehenního svalu — *Mylk* a *Tpm1*; všudypřítomné transkripty *Actb*, *Gapdh*, *Hprt*, *Ppia* a *Cyp2E1*), a to po různě dlouhé době od smrti myši, kdy mrtvé tělo bylo vystaveno laboratorní teplotě. *Alb* gen znatelně koreloval s PMI v játrech, *Srp72* gen zas ve stehenním svalu. *Rps29* gen vykazoval souvislost s PMI, a to ve všech testovaných tkáních. Na základě těchto zjištění byl sestaven matematický model, který dokázal určit stáří biologické stopy s chybou 51,4 minuty. Je však nutné poznamenat, že tento model vznikl na základě informací o degradaci RNA ve tkáních myši za laboratorních podmínek. Nicméně vztah mezi množstvím degradované RNA a stářím biologické stopy u člověka byl také potvrzen v jiných studiích, jejichž výsledky mají velký potenciál v uplatnění ve forenzní praxi. (Bauer et al., 2003a) (Bauer et al., 2003b) (Anderson et al., 2005)

5.7 Další možné aplikace

Analýzou epigenetických faktorů a mRNA lze získat některé další informace aplikovatelné ve forenzní praxi. Mezi ty významné patří zjišťování příčin a okolností smrti. Jak bylo konstatováno dříve, vnější podmínky (např. příčina smrti) vyvolávají v buňce specifické potřeby, které se odrážejí v regulaci exprese určitých genů. Mění se zejména úroveň metylace genomu — některé geny se aktivují a začnou přepisovat, jiné se naopak vypnou a hladina jejich produktů ve formě mRNA či proteinů klesá. Stav mRNA a metylace v buňkách tedy fluktuuje v čase a v závislosti na vnějších podmínkách nebo typu tkáně, z níž buňky pochází, a jejich profilování tak může odhalit skutečnosti, které přiblíží příčinu smrti.

Byla dokázána souvislost mezi otravou olovem a úrovní metylace v promotoru P16 genu ve vzorcích krve testovaných dobrovolníků. Ti, v jejichž krvi byla vysoká koncentrace olova (51-100mg/dL), vykazovali kompletní metylaci promotoru, kdežto promotor P16 genu osob s nižší koncentrací olova v krvi (6-11 mg/dL) byl pouze částečně metylovaný. (Kovatsi et al., 2010) Teoreticky by tedy bylo možné odhalit smrtelnou otravu olovem pouhou analýzou metylace promotoru P16 genu. Inaktivace P16 genu také hraje roli v rozvoji nádorů. (Veganzones-de-Castro et al., 2012)

Ve studii Nakatome et al. se pomocí metylačně-specifické PCR analyzovala úroveň metylace cirkadiálních hodinových genů, konkrétně Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2, Bmal1, Clock, Tim a Ck1e v sedmi pitevních vzorcích krve osob, jež zemřely z různých příčin. Tabulka č.2 ukazuje jak ovlivňuje příčina smrti úroveň metylace jednotlivých genů.

Příčina smrti	Per1	Per2	Per3	Cry1	Cry2	Bmal1	Clock	Tim	Ck1e
Deficit kyslíku	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Uhoření	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Vykrvácení	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Letální arytmie	-	+	+	+	-	-	-	+	-
Ischemická choroba srdeční	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Zranění hlavy	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Otrava H₂S	-	+	+	+	-	-	-	-	-

Tabulka č.2 - Způsob, jakým ovlivňuje příčina smrti úroveň metylace jednotlivých cirkadiálních hodinových genů. Znaménko plus(+) označuje metylaci daného lokusu, znaménko mínus(-) označuje nemetylovaný lokus. Převzato z (Nakatome et al., 2011), upraveno autorkou.

6. Závěr

Jak lze vidět, analýza epigenetických faktorů a mRNA skýtá velký potenciál pro uplatnění ve forenzní, ale např. i medicínské praxi. Nabízí široké spektrum cenných informací, které z pouhé sekvence DNA vyčíst nelze. Ze všech epigenetických faktorů a i v porovnání s mRNA má pravděpodobně největší budoucnost analýza metylace DNA. To především z důvodu, že DNA je i po smrti jedince relativně stabilní molekula, a proto lze analyzovat stav metylace i po dlouhé době vystavení vnějším podmínkám. Pomocí analýzy metylace lze zjistit informace o okolnostech a příčinách smrti, o pohlaví a věku donora biologické stopy, o typu tkáně, z které stopa pochází, rozlišit *ex vivo* a *in vivo* DNA a v neposlední řadě rozlišit parentální původ alely. Malé nekódující miRNA, které ovlivňují translaci mRNA v proteiny, zas charakterizují jednotlivé tkáně a tělní tekutiny, ve kterých se nachází a jejich analýza tak může pomoci identifikovat původ biologické stopy nalezené na místě činu.

Vnější podmínky rychle zasáhnou do regulace genové exprese, a s tím i do syntézy mRNA, jejíž stav odráží potřeby buňky. Analýza mRNA tak pomůže přiblížit okolnosti a příčiny smrti. Dále je tkáňově specifická (stejně jako miRNA i DNA metylace) a navíc je možné ji detekovat ve vzorku starém několik let — navzdory faktu, že mRNA v buňce degraduje většinou během několika minut.(Kohlmeier and Schneider, 2012) Některé mRNA, které kontinuálně degradují jsou vhodnými indikátory stáří biologické stopy a tedy i určení PMI.

Aby se jednotlivé analýzy zavedly do běžné forenzní praxe a zvýšily tak její kvalitu, je potřeba nalézt spolehlivé epigenetické markery a mRNA — takové, jejichž funkčnost se ověří i v dalších studiích. Recentní znalosti o využití epigenetických faktorů a mRNA ve forenzní vědě jsou teprve v počátcích, je tedy potřeba, aby vznikaly další studie v tomto směru.

7. Použitá literatura

- An, J.H., Choi, A., Shin, K.J., Yang, W.I., Lee, H.Y., 2013. DNA methylation-specific multiplex assays for body fluid identification. *Int. J. Legal Med.* 127, 35–43.
- Anderson, S., Howard, B., Hobbs, G.R., Bishop, C.P., 2005. A method for determining the age of a bloodstain. *Forensic Sci. Int.* 148, 37–45.
- Bauer, M., Gramlich, I., Polzin, S., Patzelt, D., 2003a. Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval — a pilot study. *Leg. Med.* 5, 220–227.
- Bauer, M., Polzin, S., Patzelt, D., 2003b. Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR : a possible indicator of the age of bloodstains ? *Forensic Sci. Int.* 138, 94–103.
- Benes, V., Castoldi, M., 2010. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* 50, 244–249.
- Bernstein, B.E., Meissner, A., Lander, E.S., 2007. The Mammalian Epigenome. *Cell* 128, 669–681.
- Bird, A., 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 6–21.
- Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, M.E., Sa´nchez, F.J., Sinsheimer, J.S., Horvath, S., Vilain, E., 2011. Epigenetic Predictor of Age. *Curr. Sci.* 101, 1435–1439.
- Bortolus, R., Parazzini, F., Chatenoud, L., Benzi, G., Bianchi, M.M., Marini, A., 1999. The epidemiology of multiple births. *Hum. Reprod. Update* 5, 179–187.
- Erickson, S., Erickson, S., Sta, T.D. De, Sta, T.D. De, 2008. REPORT Phenotypically Concordant and Discordant Monozygotic Twins Display Different DNA Copy-Number-Variation Pro les. *J. Hum. Genet.* 763–771.
- Fleming, R.I., Harbison, S., 2010. The use of bacteria for the identification of vaginal secretions. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4, 311–315.
- 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., Plass, C., Esteller, M., 2005. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10604–10609.
- Frumkin, D., Wasserstrom, A., Budowle, B., Davidson, A., 2011. DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Sci. Int. Genet.* 5, 517–524.

- Frumkin, D., Wasserstrom, A., Davidson, A., Grafit, A., 2010. Authentication of forensic DNA samples. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4, 95–103.
- H'mida Ben-Brahim, D., Hammami, S., Haddaji Mastouri, M., Trabelsi, S., Chourabi, M., Sassi, S., Mougou, S., Gribaa, M., Zakhama, A., Guédiche, M.N., Saad, A., 2015. Partial KCNQ1OT1 hypomethylation: A disguised familial Beckwith–Wiedemann syndrome as a sporadic adrenocortical tumor. *Appl. Transl. Genomics* 4, 1–3.
- Holasová, Š., Radilová, H., Bunčák, M., 2006. Praktická cvičení z molekulární genetiky.
- Jr, M. a C., Lopatina, N., Andrews, L.G., Tollefsbol, T.O., 2003. Transcriptional control of the DNA methyl- transferases is altered in aging and neoplastically- transformed human fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem.* 33–43.
- Kohlmeier, F., Schneider, P.M., 2012. Successful mRNA profiling of 23 years old blood stains. *Forensic Sci. Int. Genet.* 6, 274–276.
- 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. *Forensic Sci. Int. Genet.* 6, 2011–2012.
- Li, C., Zhang, S., Que, T., Li, L., Zhao, S., 2011. Identical but not the same: The value of DNA methylation profiling in forensic discrimination within monozygotic twins. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 3, 337–338.
- Lindenbergh, A., De Pagter, M., Ramdayal, G., Visser, M., Zubakov, D., Kayser, M., Sijen, T., 2012. A multiplex (m)RNA-profiling system for the forensic identification of body fluids and contact traces. *Forensic Sci. Int. Genet.* 6, 565–577.
- Madi, T., Balamurugan, K., Bombardi, R., Duncan, G., Mccord, B., 2012. The determination of tissue-specific DNA methylation patterns in forensic biofluids using bisulfite modification and pyrosequencing. *Electrophoresis* 33, 1736–1745.
- Miki, I., Yamamoto, Y., Doi, Y., Miyaiishi, S., 2011. Quantitative Analysis of DNA Degradation in the Dead Body. *Acta Med. Okayama* 299–306.
- Nakatome, M., Orii, M., Hamajima, M., Hirata, Y., Uemura, M., Hirayama, S., Isobe, I., 2011. Methylation analysis of circadian clock gene promoters in forensic autopsy specimens. *Leg. Med.* 13, 205–209.
- Nakayashiki, N., Takamiya, M., Shimamoto, K., Aoki, Y., 2009. Analysis of the methylation profiles in imprinted genes applicable to parental allele discrimination. *Leg. Med.* 11, S471–S472.

- Nakayashiki, N., Takamiya, M., Shimamoto, K., Aoki, Y., Hashiyada, M., 2008. Studies on differentially methylated parental allele in imprinted genes. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 1*, 572–573.
- 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 Sci. Int. Genet.* 13C, 147–153.
- Rakyan, V.K., Down, T. a., Maslau, S., Andrew, T., Yang, T.P., Beyan, H., Whittaker, P., McCann, O.T., Finer, S., Valdes, A.M., Leslie, R.D., Deloukas, P., Spector, T.D., 2010. Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Res.* 20, 434–439.
- Sampaio-Silva, F., Magalhães, T., Carvalho, F., Dinis-Oliveira, R.J., Silvestre, R., 2013. Profiling of RNA Degradation for Estimation of Post Mortem Interval. *PLoS One* 8.
- Schumacher, A., n.d. Design and application of microarrays for identifying of DNA methylation [WWW Document]. URL <http://www.methylogix.com/genetics/protocols.shtml-Dateien/schumachersguide2.html> (accessed 3.5.15).
- Silva, S.S., Lopes, C., Teixeira, a. L., Sousa, M.. C. De, Medeiros, R., 2015. Forensic miRNA: Potential biomarker for body fluids? *Forensic Sci. Int. Genet.* 14, 1–10.
- So, K., Tamura, G., Honda, T., Homma, N., Waki, T., Togawa, N., Nishizuka, S., Motoyama, T., 2006. Multiple tumor suppressor genes are increasingly methylated with age in non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci.* 97, 1155–1158.
- Šušla, M., n.d. Možnosti použití systému WGA = Whole Genome Amplification pro klinickou diagnostiku a výzkum [WWW Document]. URL <http://www.immunotech.cz>
- Veganzones-de-Castro, S., Rafael-Fernández, S., Vidaurreta-Lázaro, M., Orden, V.D.-L., Mediero-Valeros, B., Fernández, C., Maestro-de las Casas, M.L., 2012. P16 Gene Methylation in Colorectal Cancer Patients With Long-Term Follow-Up. *Rev. Española Enfermedades Dig.* 104, 111–117.
- Vidaki, A., Daniel, B., Court, D.S., 2013. Forensic DNA methylation profiling--Potential opportunities and challenges. *Forensic Sci. Int. Genet.* 7, 499–507.
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57–63.
- 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. *Clin. Chem.* 56, 1733–1741.

- 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 Sci. Int. Genet.* 9, 42–46.
- Winter, J., Diederichs, S., 2011. Argonaute proteins regulate microRNA stability: Increased microRNA abundance by Argonaute proteins is due to microRNA stabilization. *RNA Biol.* 8, 1149–1157.
- Yi, S.H., Xu, L.C., Mei, K., Yang, R.Z., Huang, D.X., 2014. Isolation and identification of age-related DNA methylation markers for forensic age-prediction. *Forensic Sci. Int. Genet.* 11, 117–125.
- Zbieć-Piekarska, R., Spólnicka, M., Kupiec, T., Makowska, Ż., 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 Sci. Int. Genet.* 14, 161–167.
- Zhao, G., Yang, Q., Huang, D., Yu, C., Yang, R., Chen, H., Mei, K., 2005. Study on the application of parent-of-origin specific DNA methylation markers to forensic genetics. *Forensic Sci. Int.* 154, 122–127.