

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**Marie Bílová**

**Degradace nukleových kyselin v průběhu  
autolýzy**

*Bakalářská práce*

Praha 2007

## **ABSTRAKT**

Tato práce se zaměřuje na klíčové poznatky, které se týkají změn probíhajících v tkáních po smrti organismu. Shrnuje základní informace o struktuře nukleových kyselin a buněčné smrti. Popisuje rozdíly mezi programovanou buněčnou smrtí a autolýzou s důrazem na odlišnosti v degradaci nukleových kyselin. Zároveň se zabývá metodami, které mohou být použity pro kvantitativní analýzu fragmentace nukleových kyselin, jejich výhodami a nevýhodami pro případné použití ve forenzních vědách při určování časného postmortem intervalu. Závěrem shrnuje některé metody zjišťování doby úmrtí ověřované či již rutinně používané v kriminalistické praxi.

## **ABSTRACT**

This article tries to summarize the results from works intended on changes which proceed in bodies and cells after death. In addition, it describes basic informations about structure of nucleid acids and diferencies between two types of cell death – apoptosis and autolysis (necrosis). It also compares the methods, which are possibly usable for quantitative analysis of fragmentation of nucleid acids and advantages or disadvantages for their future improvement in forensic sciences for estimation of the postmortem interval. Finally, it describes other methods tested or used in standard practice.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

postmortem interval, analýza DNA, autolýza, apoptóza, thanatochronologie

## **KEYWORDS**

postmortem interval, DNA analysis, autolysis, apoptosis, thanatochronology

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracovala samostatně a použila jen uvedené prameny a literaturu. Současně dávám svolení k tomu, aby tato diplomová práce byla umístěna v Ústřední knihovně UK a používána ke studijním účelům.

V Praze dne 10.4.2007

Marie Bílová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Patriku Mottlovi PhD. za cenné rady při přípravě a psaní této práce.

## OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>2. STRUKTURA NUKLEOVÝCH KYSELIN</b> .....	<b>7</b>
2.1. Primární struktura .....	7
2.2. Sekundární struktura .....	7
2.3. Terciální struktura .....	8
2.4. Nukleázy .....	8
<b>3. DEGRADACE TKÁNÍ, NUKLEOVÝCH KYSELIN</b> .....	<b>10</b>
3.1. Apoptóza .....	10
3.2. Autolýza .....	11
<b>4. METODY IZOLACE A DETEKCE NUKLEOVÝCH KYSELIN</b> .....	<b>12</b>
4.1. Příprava a izolace vzorku pro analýzu nukleových kyselin .....	12
4.1.1. Fenol – chloroformová extrakce .....	13
4.1.2. Adsorpce na pevný podklad .....	13
4.2. Barvení a značení nukleových kyselin .....	14
4.2.1. Feulgenovo barvení .....	14
4.2.2. Imunohistochemické metody .....	15
4.2.2.1 Značení dUTP pomocí terminální transferázy (TUNEL assays) .....	17
4.2.2.2 Imunofluorescenční barvení .....	17
4.2.3. Fluorescenční in-situ hybridizace .....	18
4.2.4. Gelová elektroforéza .....	19
4.2.5. Průtoková cytometrie .....	20
<b>5. METODY ZJIŠŤOVÁNÍ DOBY ÚMRTÍ</b> .....	<b>20</b>
5.1. Metody založené na změnách teploty těla .....	20
5.2. Chemické změny v tkáních post-mortem .....	21
5.3. Postmortem změny proteinů a nukleových kyselin .....	21
5.3.1. Degradace proteinů .....	21

5.3.2. Degradace nukleových kyselin .....	22
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>24</b>
<b>7. POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>25</b>

## 1. ÚVOD

Zjištění přesného času úmrtí patří již mnoho let k základním otázkám forezních věd. Tato problematika se samozřejmě dotýká i otázek v trestním právu a je důležitá právě pro rychlejší a přesnější průběh vyšetřování v kriminalistice.

I přesto, že bylo ustanoveno mnoho metod na stanovení doby smrti, většinou se jedná o jednoduché metody založené na analýze fáze posmrtné ztuhlosti – rigor mortis, odhadu podle tělesné teploty nebo výpočtu pomocí míry stahů svalů při uměle dodaném elektrickém impulsu, které jsou ale zatížené velkou statistickou chybou v důsledku nezanedbatelného vlivu vnějších podmínek. Práce zaměřující se na obsahu žaludku a trávicí trubice se mohou použít také pouze v omezeném počtu případů. Ostatní metody jako např. forezní entomologie jsou velice vhodné, ale pro určení postmortem intervalu v delším časovém horizontu. Molekulární analýzy se v posledních letech ve forezních vědách velmi rozvíjí, především ale v molekulární genetice, kde slouží k identifikaci osob, určování paternity. V oblasti určování přesného postmortem jsou molekulární metody ještě na začátku vývoje. Vědeckých prací zabývajících se touto problematikou je naprosté minimum. I přesto lze očekávat, jako v ostatních biologických disciplínách, rozmach molekulárních metod, převážně zaměřených na časnou degradaci nukleových kyselin a proteinů. Ty se v budoucnu mohou stát základním pilířem kriminalistických analýz.

## 2. STRUKTURA NUKLEOVÝCH KYSELIN

### 2.1. Primární struktura

Řetězce nukleových kyselin se skládají ze tří základních částí. Řetězec tvoří cukr-fosfátová kostra, složená z  $\beta$  D-ribosy v případě RNA a  $\beta$  D-deoxyribosy u DNA a fosfátu, zbytku kyseliny fosforečné, který je k cukru vázán fosfodiesterovou vazbou. Díky tomuto fosfátovému esteru jsou nukleové kyseliny silnými kyselinami a při neutrálním pH se chovají jako anionty. Podle své vazby k 3C a 5C cukru na každé straně rozlišujeme 3' konec a 5' konec. Na 1'C deoxyribosy se váží dusíkaté báze, které umožňují spojení dvou řetězců pomocí vodíkových můstků. Tyto vodíkové můstky mezi  $-NH_2$  a  $-OH$  jsou stabilní při pH od 4 do 9. Báze jsou slabě bazické a bez náboje. Adenin a thymin se k sobě váží dvěma můstky a guanin a cytosin třemi, čímž je určena vzájemná komplementarita. Lidská jaderná DNA je tvořena  $3.2 \times 10^9$  nukleotidů. (Strachan, 1999)

U RNA se namísto thyminu objevuje uracil a časté jsou i další báze např. pseudouridin, inosin, hypoxantin. RNA tvoří přes 95% všech nukleových kyselin v buňce. Nukleové kyseliny mají maximum absorpce UV světla při 260 nm, jednovláknová DNA dává o 20 - 30% větší absorpenci než dvouvláknová. (Průša, 1998)

### 2.2. Sekundární struktura

Molekula DNA je velmi stabilní. Dvě vlákna jsou antiparalelně spojeny procesem zvaným hybridizace do dvoušroubovice. Vlákna DNA se mohou u stáčet pravotočivě i levotočivě, odchylky můžeme najít i v počtu párů bází na otočku. Sekundární struktura může mít vliv na reaktivitu nukleové kyseliny. V nativním stavu se vyskytuje v konformaci A, B, C, Z. (Butler, 2001)



RNA tvoří naopak pouze jednoduché smyčky nebo je bez speciální sekundární struktury. Nejobvyklejší strukturou je tzv. struktura vlásenky, která vyžaduje komplementaritu části řetězce.

### **2.3. Terciální struktura**

DNA musí být pro její obrovskou délku sbalena okolo histonů a nehistonových chromozomálních proteinů. Celý tento komplex označujeme jako chromatin.

Histony stáčí řetězec DNA do tzv. nukleosomu. Nukleosom je tedy tvořen histonovým oktamerem tzn. histonovými proteiny H2A, H2B, H3 a H4, přítomných vždy po dvojicích (viz obr.1) a 146 páry nukleotidu DNA obtočenými okolo tohoto proteinového oktameru. Proteiny obsahují velké množství argininu a lysinu, které jim udělují kladný náboj. Tím se neutralizuje záporný náboj DNA. Struktura histonů je velice evolučně konzervovaná, tudíž jakákoliv nepatrná odchylka v pořadí aminokyselin je obvykle pro organismus letální.

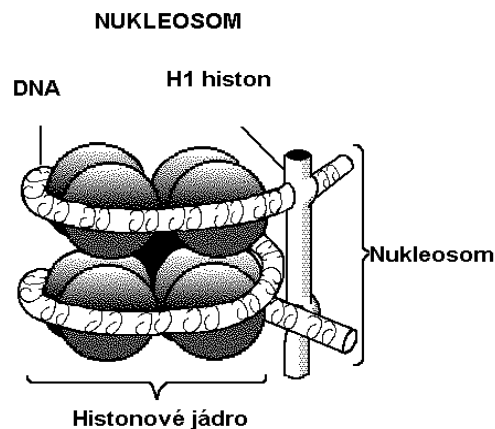
Každý nukleosom je s dalším spojen pomocí spojovací DNA, jejíž délka se obvykle pohybuje od několika párů bazí do asi 80 párů. Proteiny jsou spojeny s DNA 142 vodíkovými můstky v každém nukleosomu a dále čtenými hydrofobickými interakcemi. Lidská DNA obsahuje přibližně 30 milionů nukleosomů. Toto vlákno je již široké okolo 30 nm. Ve skutečnosti se jedná o dynamickou strukturní mozaiku.

### **2.4. Nukleázy**

Nukleové kyseliny jsou mezi sebou štěpeny enzymy zvanými nukleázy . Můžeme je rozdělit na endonukleázy a exonukleázy podle způsobu štěpení vlákna. Exonukleázy hydrolyzuje fosfodiesterové vazby z 5' i 3' konce řetězce. Endonukleázy naopak štěpí specifická místa uvnitř řetězce. Otázkou zůstává, jaké nukleázy ovlivňují degradaci nukleových kyselin postmortem a které jsou naopak již na začátku autolýzy rozloženy proteázami. (Alberts, 2002)

Deoxyribonukleázy jsou enzymy štěpící DNA. Jejich funkce jsou velice různorodé. Hydrolyzují řetězec bez jakékoliv specifity nebo jsou naopak vysoce specifické. Mohou štěpit dvouvláknovou i jednovláknovou DNA.

Ribonukleázy štěpí RNA. Každá RNázová rodina má často velice odlišnou sekvenci aminokyselin, její sekundární struktura je však velmi podobná. Není jasné, v čem spočívá vysoká specifita sestřihu RNA in vivo, protože při pokusech in vitro jejich specifita prudce klesala. Stejně tak, pokud bychom vycházeli ze známých informací o délce života, procesech a různorodosti RNA, museli bychom předpokládat, že v buňkách musí být přítomno mnoho desítek až stovek různých RNáz, což je v praxi nemyslitelné. Je proto pravděpodobné, že vysoká specifita degradace a zpracování závisí více na lokalizaci a struktuře RNA, než na samotných RNázách. (D'Alessio, 1997).



Obr.1 schéma nukleosomu  
(zdroj: [ejb.ucv.cl/gmunoz/nucleosome.gif](http://ejb.ucv.cl/gmunoz/nucleosome.gif))

### 3. DEGRADACE TKÁNÍ, NUKLEOVÝCH KYSELIN

Tkáně zanikají v průběhu života, i po smrti. Jejich degradace programovanou buněčnou smrtí je nedílnou součástí života bez které by nemohlo docházet ke správnému ontogenetickému vývoji člověka. Naopak poškození buněk a smrt vyvolá nekontrolovanou degradaci tkání, která se může šířit dále do organismu.

#### 3.1. Apoptóza

Apoptóza může nastat v buňce následkem externích vlivů, jako jsou hypoxie, nedostatek živin, vlivem virových infekcí stejně jako nekróza. Jejím hlavním smyslem v těle je ale udržovat správný ontogenetický vývoj orgánů, je tedy nezbytné, aby byla řízena i interně. Je tedy ovlivněna činností hormonů, enzymů s proteázovou aktivitou – caspáz a HOX geny. Apoptóza se tedy může jednoduše odhalit právě díky odlišným hladinám enzymů. Denně takto zanikne 50-70 miliard buněk.

Mikroskopicky lze sledovat specifické apoptotické procesy jako buněčné smrštění způsobené rozpadem cytoskeletu a kondenzace chromatinu v procesu zvaném pyknóza. Časná stádia apoptózy jsou téměř nezjistitelná, právě proto, že si buňka dlouho udržuje svůj tvar a velikost. Následuje karyorheze, kdy se rozpadá jaderný obal a DNA se fragmentuje. Až později se buňka postupně rozpadne na jednotlivá apoptotická těla, která mohou být fagocytována. Zároveň na svém povrchu vystavuje fosfatidylserin, který je v průběhu apoptózy přenesen z cytosolické části plazmatické membrány na její extracelulární okraj a tím se stává buňka rozpoznatelnou pro makrofágy, které jí poté fagocytují. Při apoptóze se DNA fragmentuje velice pravidelně na segmenty o délce 180 bp nebo násobků 180 bp). V mnohých typech buněk se naopak tvoří 300 – 50 kb velké fragmenty (Oberhammer, 1993). Mohou za to  $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$  dependentní endonukleázy, které přednostně štěpí DNA mezi nukleosomy, čímž vznikají pravidelné úseky (Yakovlev, 2000). To způsobuje charakteristické proužkování na agarozovém

gelu, podle kterého můžeme apoptosu odlišit např. od smrti toxickými látkami nebo ischemií.

Autolytické buňky se také při fragmentaci do apoptotických liší rozdílnou tvorbou zlomů. U apoptotických buněk můžeme v raném stadiu nalézt jak tupé konce, tak 3' i 5' lepivé konce, zatímco u časné nekrózy se tvoří výlučně 5' lepivé konce, což vyvolává další otázky do diskuze o specifických mechanismech degradace DNA. (Didenko,2003).

### **3.2. Autolýza**

Autolýza je posmrtný rozkladný chemický pochod, při kterém dochází k degradaci tkání v těle organismů. Narozdíl od apoptózy se jedná o pasivní proces. Při tomto komplexním procesu dochází k zániku energetického metabolismu a chemické, fyzické i morfologické integrity. Aktivní membránový transport se zastaví, čímž selže selektivní membránová permeabilita a ionty difundují po svém koncentračním gradientu. (Fink, 2005) Tyto iontové změny mohou také být zkoumány kvůli zjištění doby úmrtí.

Zároveň se uvolňují proteolytické enzymy a nukleázy, přítomné v každé buňce, které natráví nejdříve samotné buňky a poté celé tkáně. Postupně je celé tělo rozloženo na jednoduché produkty, jako je voda, oxid uhličitý, amoniak, merkaptany, sulfan apod. U různých tkání i živočišných druhů amozřejmě probíhá v různé rychlosti i intenzitě.

Jako první viditelnou fází autolýzy, která se však týká pouze svalů můžeme označit jako tzv. rigor mortis, který je specifický svalovou ztuhlostí způsobenou hydrolýzou ATP. Myosin tak zůstává navázán na aktin a ztuhlost přetrvává až do doby, kdy jsou myofibrilární proteiny hydrolyzovány proteolytickými proteiny (katepsiny, kalpainy) a aktinomyosinový komplex disociuje. Glykogen se v těle odbourává na kyselinu mléčnou a ATP na kys. inosinovou, čímž se snižuje pH.

Průběh autolýzy je závislý na lokálních anatomických faktorech (uložení a postavení orgánu v těle) a tedy na tkáňově a buněčně specifických odchylkách. Nemalou roli hrají chemické faktory jako pH, teplota těla nebo míra glykolýzy v

buňce. Pro histologickou analýzu musíme autolýzu zastavit fixací např. ve formaldehydu nebo ihned hluboce zmrazit. (Henssge, 2002)

## **4. METODY IZOLACE A DETEKCE NUKLEOVÝCH KYSELIN**

K detekci degradace nukleových kyselin máme k dispozici mnoho potenciálních histologických a molekulárních metod. Tato kapitola představuje ty nejpodstatnější. Většina výzkumů probíhá na zvířecím modelu. Pro svou podobnost k lidským nukleovým kyselinám se nejčastěji používají potkani (*rattus norvegicus*) nebo laboratorní myši (*mus musculus*).

### **4.1. Příprava a izolace vzorku pro analýzu nukleových kyselin**

Pro klasické histologické a imunohistochemické barvení se používá tkáňový řez zalitý do parafínu nebo řez zmražený. Při zalévání do parafinových bločků je nutné tkáň zafixovat (obvykle se používá roztok formaldehydu). Poté musíme vzorek odvodnit vzestupnou koncentrační etanolovou řadou. Poté je tkáň projasněna organickým rozpouštědlem, např. xylenem, mísitelným s alkoholem i parafínem a následně zalita do parafínu. Tyto vzorky je možné nakrájet na řezy silné 2-7 $\mu$ m. Fixace ale může zničit enzymy a různá vazebná místa pro antigeny. V tomto případě je vhodné tkáň prudce zmrazit na teplotu -150 až -170°C v tekutém dusíku. Poté jsou barveny imunohistochemickými metodami. Zmražení je oproti zdlouhavému zalévání velice rychlé a umožňuje nám pozorovat vzorky 5-10 $\mu$ m silné. (Stevens, 2005)

K elektroforetické analýze je nutné nukleové kyseliny izolovat z tkáně. Prvním krokem při izolaci je vždy odstranění extracelulární matrix proteinázami (trypsin, kolagenázy) a lyze buněk. Provádí se rozpuštěním biomembrán a denaturací proteinů detergentem (Triton X-100, laurylsíran sodný). Pro zvýšení čistoty se k lyzačnímu roztoku přidává proteináza K, která štěpí i histony navázané na DNA a uvolní tedy stočený řetězec. Lyzát se přenesse do roztoku pufru

obsahující EDTA (etylendiaminotetraoctová kyselina). Ta působí jako inhibitor nukleáz tím, že vychytává vápenaté ionty, bez kterých se nukleázy nemohou zaktivovat. Tím se zabrání rozštěpání uvolněné nukleové kyseliny. Izolované nukleové kyseliny je v mnoha případech nutné mnohonásobně amplifikovat pomocí PCR (polymerase chain reaction). (Raclavský, 2003)

#### *4.1.1. Fenol-chloroformová extrakce*

K lyzátu se přidá fenol, chloroform a izoamylalkohol. Na izolaci RNA je nutné použít fenol o vyšší teplotě a nižším pH. Roztok je dokonale odstředěn za vzniku vodné a chloroformové fáze mezi nimiž je vrstva sražených proteinů. Nukleové kyseliny jsou přítomny ve vodné fázi. Extrakce se několikrát opakuje, aby byly proteiny dokonale odstraněny. Nukleové kyseliny jsou poté z vodné fáze vysráženy koncentrovaným etanolem. Sraženina ale může obsahovat různé soli, které se musí odmyt 70% etanolem.

Pokud se pracuje pouze s DNA, je nezbytné RNA ve sraženině rozštěpit RNA nukleázami. Naopak pro práci s RNA je nutné inhibovat veškeré RNázy, případně odstranit DNA DNázami. Můžeme také selektivně srážet RNA pomocí LiCl. Pro izolaci samotné mRNA se také používá afinitní chromatografie na oligo-dT kolonách. Izolace RNA je obecně problematictější, kvůli všudypřítomným RNázám. Je nutné ji i po izolaci chránit uchováním při velmi nízké teplotě s přítomností inhibitorů nukleáz. Extrakcí získáme směs veškerých RNA z buňky (Carracedo, 2005).

#### *4.1.2. Adsorpce na pevný podklad*

Tato metoda je založena na předpokladu, že nukleové kyseliny adherují na silikátový povrch (případně speciální pryskyřice) v přítomnosti choanotropních solí (iodid sodný, guanidin thiokyanát, guanidin hydrochlorid). Do roztoku s lyzátem se přidají choanotropní soli a silikátové částice. Nukleové kyseliny ulpí na částicích a zbytek lyzátu odsajeme. Nukleové kyseliny vyvážeme přilítím vody

nebo pufru. Tato metoda je mnohem rychlejší a pohodlnější, má vyšší výtěžek a čistotu produktu. Tento princip proto využívají mnohé komerční farmaceutické firmy na výrobu předem připravených souprav – kitů, čímž se práce velice zjednoduší. (Raclavský,2003)

## 4.2. Barvení a značení nukleových kyselin

### 4.2.1. Feulgenovo barvení

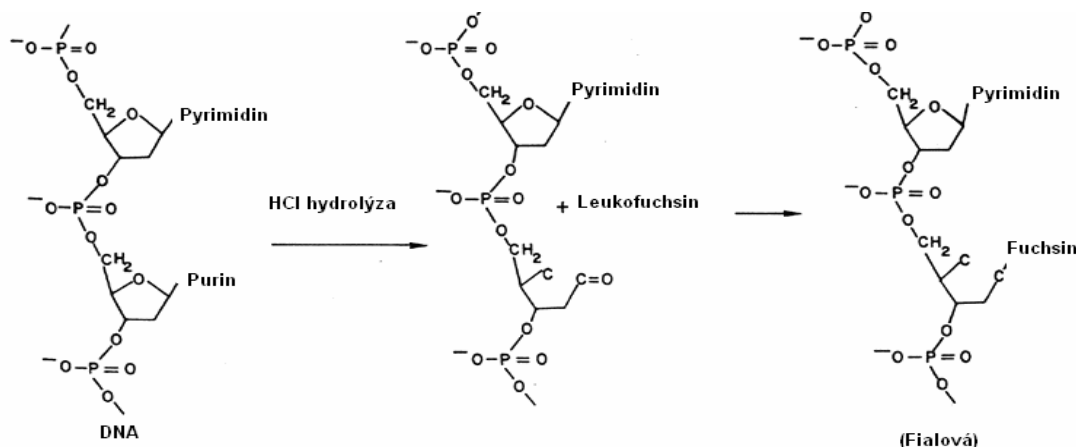
Feulgenovo barvení patří k semikvantitativním cytochemickým metodám barvicím DNA a chromosomy. Je specifické pouze pro DNA, RNA se jím nebarví.

DNA je nejdříve hydrolyzováno horkou (uvádí se asi 60 °C) kyselinou chlorovodíkovou. Tím se zbaví svých purinových bazí a na deoxyriboze se tím uvolní aldehydové skupiny, které může se nabarví Schiffovým reagentem, což je vodný roztok bazického fuchsinu. Můžeme použít i světle zelené (light green SF yellowish) kontrastní barvení pozadí. Vznikne tedy červený obraz DNA se zeleným pozadím. Uvádí se, že mitochondriální DNA má tak malou koncentraci, že se touto metodou nenabarví. Vzorky se dehydratují ethanolem a projasňují xylenem jako při klasickém histologickém barvení. Pro vyhodnocení výsledků můžeme použít mikrospektrofotometr, kterým naměříme intenzitu růžového zbarvení. (Jelínek, 2007)

Jako vhodné tkáně pro případné využití v praxi se předpokládají jaterní tkáň (Lina,2000).



Obr. 2 Regenerující se buňky mloka, barveno Feulgenovou metodou  
(zdroj: [www.snv.jussieu.fr/.../Feulgen/exfeul.htm](http://www.snv.jussieu.fr/.../Feulgen/exfeul.htm))



Obr.3 Schéma feulgenovy reakce

(<http://bio.winona.edu/berg/307s04/Labs/documents/histoch.doc>)

#### 4.2.2. Imunohistochemické barvení

Imunohistochemické barvení nám umožňuje vizualizovat distribuci a lokalizaci specifických buněčných komponent. Tkáně jsou barveny pomocí značených protilátek proti specifickým molekulám (antigenům), obvykle proteinům.

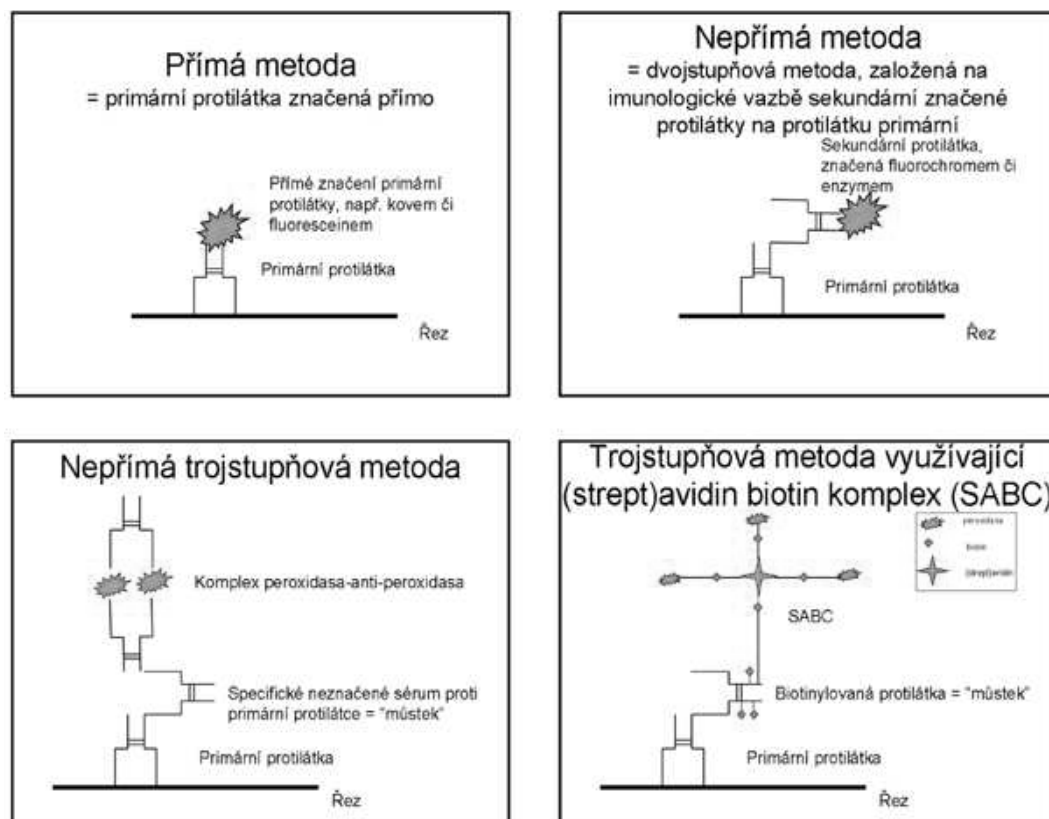
Použité protilátky můžeme rozdělit na monoklonální, které jsou vyráběny z tkáňových kultur z klonu B lymfocytů a jsou specifické jen pro jeden druh antigenu. Druhým typem jsou protilátky polyklonální, z přirozených imunitních reakcí zvířat, které jsou tedy specifické pro více druhů epitopů antigenu. Nyní jsou mnohem více využívány protilátky monoklonální.

Na antigeny se můžou navázat značené primární protilátky. Používají se, pokud je antigen přítomen v dostatečně velkém množství a obvykle u nefixovaných tkání. Vícestupňové metody jsou komplikovanější, ale mnohem citlivější. U dvoustupňového značení se na neznačenou primární protilátku, což je



imunoglobulin nebo sérum specifické proti prokazovanému antigenu. Na ten se teprve naváže sekundární protilátka proti Fc-fragmentu protilátky primární, která je značená fluorescenčním barvivem nebo enzymem.

U trojstupňového značení je navíc použitý tzv. můstek, což je spojovací protilátka mezi značeným komplexem a primární protilátkou. Tento můstek vysoce amplifikuje signál. Jako značené komplexy se používají peroxidáza-anti-peroxidázový nebo alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatázový komplex. V současnosti nejcitlivější metodou je značení sekundární protilátky biotinem a jeho navázání na avidin- biotinový komplex. Ten je označen křenovou peroxidázou. (obr.4). Peroxidáza nám vytvoří hnědé, alkalická fosfatáza naopak červené nebo modré značení. (Beranová, 2003)

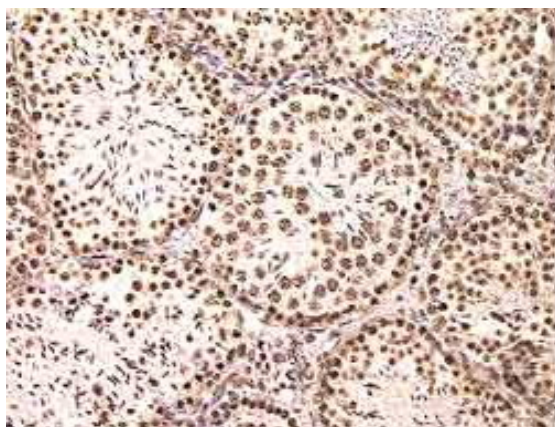


obr.4 Příklady typů imunohistochemických značení

(zdroj: [http://www.lfp.cuni.cz/Histologie/arch/ihc\\_low\\_res.pdf](http://www.lfp.cuni.cz/Histologie/arch/ihc_low_res.pdf))

#### 4.2.2.1 Značení dUTP pomocí terminální transferázy (TUNEL assays)

Při autolýze dochází k fragmentaci DNA. Na řetězci se tedy tvoří zlomy, které následně můžeme vizualizovat pomocí terminální deoxynukleotidyl transferázy. Transferáza katalyzuje připojení nukleotidů na 3'OH konec zlomů aniž by potřebovala templát či primer. Narozdíl od DNA polymerázy také nevyžaduje směs všech čtyř nukleotidů, stačí jí jeden, nejčastěji používaný je deoxyuridin trifosfát. Je schopná také připojit nukleotidy na velmi krátké fragmenty, dokonce i na jednovláknový řetězec. (Didenko, 2002) Tím by se tedy mohla stát vhodnou pro detekci délky autolýzy. Dříve byla tato metoda považována za specifickou pro apoptózu, ukázalo se však, že při vizualizaci touto metodou není možné rozeznat apoptotické, nekrotické a autolytické buňky. (Grasl-Kraup, 1995)



Obr. 5 Řez plicemi, barveno diaminobenzodinem (DAB) a pomocí terminální transferázy

(zdroj: [www.uphs.upenn.edu/penngen/gtp/cmc\\_images.html](http://www.uphs.upenn.edu/penngen/gtp/cmc_images.html))

#### 4.2.2.2 Imunofluorescenční barvení

Nukleové kyseliny je možné také barvit pomocí látek, které při excitaci UV nebo viditelným zářením emitují světlo. Mezi používané látky patří DAPI a

Hoechstovo barvení. Obě se dají použít k barvení živých i fixovaných buněk. Jsou kancerogenní a mutagenní.

DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol) se pevně váže do malých žlábků DNA a emituje modré světlo. Váže se i na RNA, ale fluoreskuje pouze slabě. Hoechstova barviva jsou bis- benzimidazoly, které jsou excitovány při 350 nm a emitují okolo 461 nm vlnové délky. Obvykle se používá tzv. Hoechst 33258 a Hoechst 33342. Narozdíl od DAPI jsou více lipofilní a lépe tedy procházejí plazmatickou membránou.

#### *4.2.3. Fluorescenční in-situ hybridizace*

Tato technika umožňuje rozpoznat a najít předem určené sekvence nukleových kyselin pomocí specificky značených sond. Nejčastěji se v praxi používá k diagnostice genetických onemocnění. Díky této metodě můžeme nalézt mutaci v daném genu a správně nemoc diagnostikovat. Jeho využití je v molekulární biologii oproti starším metodám velice všestranné, zvláště díky tomu, že zkoumané buňky se nemusí aktivně dělit.

Ke značení se používají sondy, neboli řetězce DNA nebo RNA komplementární k hledané sekvenci. DNA sondy se vytváří z živých buněk klonováním nebo PCR. RNA sondy naopak vytvoříme z DNA pomocí plazmidových vektorů. Malé oligonukleotidy o délce 15-50 nukleotidů je možné vytvořit přímou chemickou syntézou z jednotlivých nukleotidů od 3' konce (Griffins, 1999).

Při výběru sondy je nezbytné zohlednit jejich specifitu, tedy pravděpodobnost, se kterou se naváže na správnou oblast. Specifita se zvyšuje s délkou sondy, avšak u dlouhých sond se zvyšuje riziko přítomnosti oblastí komplementárních k jiné části sondy (self-complementary regions). Za optimální délku můžeme považovat 32-36 bází. (Wilkinson, 1998). Naopak příliš krátké sondy mohou nespecificky hybridizovat k více oblastem na zkoumané nukleové kyselině. Délka a složení sondy také může ovlivnit kvalitu hybridizace. Delší sondy s vyšším obsahem guaninu a cytosinu se váží na templátovou kyselinu

pevněji a rychleji. Hybridní kyselina je tedy stabilnější a vytvoříme ji při výhodnějších podmínkách.

Abychom mohli určenou sekvenci označit, je nejdříve nutné, v případě DNA, oddělit oba řetězce, tedy denaturovat oddělením párů bází. Tato jemná denaturace (nesmí se narušit morfologie) se provádí ošetřením formamidem. Značená sonda hybridizuje k řetězci nukleové kyseliny za zvýšené teploty a přebytečné sondy jsou poté vymyty z preparátu (Brown, 2002).

Dříve se používaly hlavně radioaktivně značené sondy ( $^{32}\text{P}$ ), ale kvůli jejich nízké senzitivitě a problémům s rozptylem signálů se dává přednost fluorescenčnímu barvení. Sondy také můžeme také značit různými antigeny. Pokud použijeme fluorescenční barviva emitující při různých vlnových délkách, můžeme podle barev určit i polohu hledané sekvence na chromozomu (Wilkinson, 1998).

In-situ hybridizaci je možné využít ke zjištění distribuce RNA v buňkách a tkáních. V tomto případě je nežádoucí vystavit buňku vysokému pH. Dvoušroubovice DNA tedy zůstane spojena a značené sondy se mohou navázat pouze na RNA.

Jako vhodnou metodu můžeme in-situ hybridizaci použít pro určení fragmentace nukleových kyselin v průběhu autolýzy. Sonda se v tomto případě naváže pouze pokud námi hledaná sekvence není ještě degradována. Podle výsledné fluorescence je tedy možné zjistit, které oblasti degradují dříve a které později.

#### *4.2.4. Gelová elektroforéza*

Elektroforéza je metoda, která nám umožňuje rozdělovat molekuly podle jejich velikosti, tvaru a elektrického náboje, takže je můžeme použít i na zjištění fragmentace DNA. Fragmenty nukleových kyselin se nanášejí na polyakrylamidový nebo agarozový gel. Poté se gelem pohybují podle svého náboje k anodě v případě, že mají záporný náboj (tedy i nukleové kyseliny) a ke katodě v případě kladného náboje. Větší molekuly se pohybují gelem pomaleji. Díky oběma těmto jevům vznikají charakteristické proužky, které se poté srovnávají s markerovými

molekulami o známé velikosti. K vizualizaci výsledku můžeme použít barvení stříbrem, fluorescentním barvivem jako např. ethidium bromid nebo radioaktivními izotopy. Tato metoda může být velice přesná, vyžaduje však izolaci DNA z buněk a poměrně mnoho materiálu. Tím se stává oproti ostatním metodám mnohem náročnější. (Lodish, 2002)

#### 4.2.5. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie patří mezi rychlé a velice přesné metody, odhalující změny ve velikosti a struktuře buněk. Používá se zejména k rozboru změn v apoptotických buňkách a ke zjišťování, zda je buňka apoptotická nebo nekrotická. Často je kombinována s pozorováním morfologie buňky pod světelným nebo elektronovým mikroskopem, zjišťováním propustnosti plazmatické membrány pro různé látky nebo mitochondriálním potenciálem. (Darzynkiewicz, 1997) Změny detekujeme pomocí rozptylu světelného signálu, který je vyzařován buňkami procházejícími laserovým paprskem průtokového cytometru. Intenzita světla rozptýleného v předním směru koreluje s velikostí buňky, intenzita bočního rozptylu souvisí se zrnitostí. Nekroza se tedy projevuje počátečním vzrůstem a následným prudkým poklesem schopnosti rozptylovat světlo v obou směrech zároveň. To souvisí s protržením plazmatické membrány a vylitím buněčného obsahu. (Nunno, 2002)

## 5. METODY ZJIŠŤOVÁNÍ DOBY ÚMRTÍ

### 5.1. Metody založené na změnách teploty těla

Bylo zpracováno mnoho metod zkoumajících teplotní změny různých částí těla a byla snaha vytvořit jednoduché matematické modely na základě odchylek mezi aktuálními a vypočítanými postmortem intervaly podle teploty. Bohužel tyto

metody jsou v praxi obtížně využitelné kvůli obrovskému vlivu vnějších podmínek. Teplota živého člověka je velmi individuální a mění se v závislosti na denní době, zdraví či nemoci oběti a stresu. Mimo to, postmortem teplota je velmi ovlivněna slunečním zářením, okolní teplotou a vlhkostí vzduchu, řešení je tedy velice složité a zatížené velkou statistickou chybou (Henssge 2002).

## **5.2. Postmortem chemické změny v tkáních**

Pro biochemické analýzy se dříve používaly postmortem změny hodnot různých iontů ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{+II}$ ,  $\text{K}^+$ ) a organických látek (glukóza, glykogen, hypoxantin) v mozkomíšním moku a krvi. Od konce šedesátých let se od těchto způsobů začalo upouštět a díky své biochemické struktuře se začaly využívat látky obsažené ve sklivci. Pro vyšetřování je sklivec také velmi výhodný vzhledem k jeho izolaci a tedy i minimální bakteriální kontaminaci obsahu. Autolýza je tak pomalejší než v ostatních tekutinách. (Madea, 2005) Nejběžněji analyzované jsou hodnoty draslíku, které ve sklivci lineárně rostou se stoupající teplotou i postmortem intervalem. Pokud se ještě zkombinují se známými hodnotami např. (také lineárně rostoucího) hypoxantinu, můžeme velmi dobře zhodnotit dobu úmrtí (Kalra, 2006).

Bylo také zjištěno, že hodnoty sodíku a chloru jsou stabilní při 4°C po 48 hodin, při vyšších teplotách samozřejmě klesají hodnoty koncentrace dříve. Koncentrace glukosy se snížila do tří hodin o více jak polovinu při všech vyšetřovaných teplotách. Nicméně jako látky pro vyšetřování jsou méně vhodné (Schoning, 1980).

## **5.3. Postmortem změny nukleových kyselin a proteinů**

### **5.3.1. Degradace proteinů**

Při výzkumu vztahu mezi degradací proteinů a post mortem intervalem bylo zjištěno, že pro případné analýzy by mohla být použita rozdílná degradace aktinu a myosinu jako parametr pro zjištění post mortem intervalu. Pokus byl uskutečněn na jaterní tkáni potkanů (*rattus norvegicus*). Potkani byly usmrceni éterem a uchovány po 18 dní při teplotě 21°C. Vždy po 24 hodinách se provedl odběr jaterní tkáně. Aktin byl metodou Western blotting jasně detekovatelný do osmého dne a naprosto nedetekovatelný až po desátém dnu. Zato  $\alpha$  i  $\beta$  tubulin se staly neidentifikovatelnými již po čtvrtém dnu. Případný model jejich rozdílné degradace by tedy mohl být po dalších výzkumech v praxi použit (Xiao, 2005).

Vyšetřovala se též degradace srdečního troponinu I, spoluzodpovědného za svalovou kontrakci. Za tímto účelem se na vzorcích z šesti lidských těl opět prováděla elektroforéza a následná vizualizace pomocí Western blotu se specifickými monoklonálními protilátkami. Prokázala se pseudolineární korelace mezi procentem degradovaného troponinu a logaritmem času uplynulého od smrti. (Sabucedo, 2003)

### 5.3.2. Degradace nukleových kyselin

Stabilita DNA se v různých tkáních liší. Studie prokázaly vyšší stabilitu DNA v kortexu, lymfatických uzlinách a bederním svalu. Naopak u sleziny a ledvin již po 5.dnu nastala masivní degradace DNA. Míra autolýzy obecně stoupá se vzrůstající teplotou a infekčními onemocněními, proto tyto externí vlivy při analýzách nesmíme nikdy opomenout a počítat s nimi ve vyhodnocení výsledků. (Bar, 1988).

Pro odhalení časného postmortem intervalu pomocí průtokové cytometrie se ukázaly jako nejvhodnějším orgánem játra, kde byla nalezena lineární korelace mezi mírou degradace a časem uplynulým od umrtí. (Nunno,2002).

Byla zjištěna závislost mezi degradací DNA v jaterních buňkách a dobou umrtí. Vzorky z patnácti potkaních jater byly nejprve zafixovány formalínem a poté nabarveny Feulgenovou metodou. Následná analýza pomocí průměrné a integrální optické density statisticky také dokázala lineární závislost mezi

postmortem intervalem a degradací DNA v jaterních buňkách. (Lina,2000). Tato metoda je relativně levná a přesná, proto je vhodné ji použít pro výzkum dalších orgánů a tkání, případně jí později využít v praxi.

Naopak při studii stability mozkové RNA u potkanů a lidí se ukázaly odlišné výsledky. Vyhodnocení bylo kvantitativní (RNA / g tkáně) a kvalitativní (spojitost degradace). Potkaní vzorky, byly shromážděny do 48 hodin postmortem a elektroforeticky analyzovány. U mozkové mRNA nebyla prokázána žádná degradace. Ani při in vitro translaci se neprokázaly žádné změny v proteinových produktech těchto RNA v průběhu autolýzy. Oproti tomu lidské vzorky z mozkové kůry při stejné analýze vykazovaly mírnou degradaci. Tato degradace však vůbec nekorelovala s postmortem intervalem. To svědčí o vysoké míře stability RNA v mozku a naznačuje rozdíly v degradaci DNA a RNA v těle. (Johnson, 1986)



## 6. ZÁVĚR

Autolýza je fenoménem zahrnujícím mnoho specifických procesů na molekulární úrovni. Jako u každého typu buněčné smrti, i zde jsou aktivovány specifické enzymy, ale zároveň jsou autolytické buněčné procesy ovlivněny nekontrolovaným zánikem organel a aktivního mezibuněčného látkového transportu.

Sledování postmortem změn nukleových kyselin je stále méně prozkoumanou oblastí forenzních věd. Práci věnujících se této problematice je velice málo. Existuje více metod, dnes běžně používaných v jiných odvětvích molekulární biologie a potenciálně využitelných pro analýzu těchto látek. Avšak pouze dalšími dlouhodobými výzkumy se může tato možnost zjišťování přesné doby úmrtí stát běžnou součástí kriminalistického vyšetřování.

Stejně tak zůstává otázkou, které orgány a tkáně budou více či méně vhodné pro analýzu a zda některá z těchto molekulárních metod bude moci v dohledné době nahradit dnes běžné studie fáze posmrtné ztuhlosti nebo změn teploty.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- Alberts B.:** Molecular biology of the cell, 4.th edition, Garland science, 2002
- Bar W., Kratzer A.:** Postmortem stability of DNA, Forensic Sci Int., 39(1):59-70  
1988
- Beranová M., Tonar Z.:** Principy a příklady imunohistochemie  
Ústav histologie a embryologie LF UK, Plzeň, 2003
- Brown T.A. –** Genomes, 2nd edition, Garland Science, 2002
- Butler J.M.:** Forensic DNA Typing: biology & technology behind STR markers  
Elsevier, 2001
- Carracedo A.:** Forensic Dna Typing Protocols, Humana Press, 2005
- D'Alessio G., Riordan J.F.:** Ribonucleases: structure and function, Academic  
Press, 1997
- Darzynkiewicz Z.:** Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and  
accidental cell death (necrosis), Cytometry, 27(1):1-20, 1997
- Didenko V.:** Early necrotic DNA degradation – Presence of Blunt- ended DNA  
breaks, 3 and 5 overhangs in Apoptosis, but only 5 overhangs in early  
necrosis, American journal of pathology, 162, 1571-1578, 2003
- Didenko D.:** In Situ Detection of DNA Damage: Methods and Protocols, Humana  
Press, 2002
- Fink S.L., Cookson F.L.:** Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic  
Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells  
Infection and Immunity, 73(4), 1907-1916, 2005
- Grasl-Kraupp B.:** In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to  
discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death,  
Hepatology, 21(5), 1465-8, 1995
- Griffiths A.:** Introduction to Genetic Analysis, 7th edition, W. H. Freeman & Co.,  
1999
- Henssge C.:** Estimation of the Time Since Death in the Early Postmortem Period,  
2<sup>nd</sup> edition, Oxford University Press, 2002

- James R.A., Hoadley P.A.:** Determination of Postmortem Interval by Sampling Vitreous Humour, *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 18(2), 158-162, 1997
- Jelínek R.:** Histologie, embryologie, 2007  
dostupné z: <http://www.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf>
- Johnson S.A, Morgan D.G.:** Extensive postmortem stability of RNA from rat and human brain, *Journal of neuroscience research*, 16(1), 267- 280, 1986
- Kalra J., Neufeld H.:** Vitreous Humor Biochemical Constituents: Applications in Postmortem Interval, *Clinical Chemistry*, 52, 2006
- Lin L.Q.:**An experimental study on the relationship between the estimation of early postmortem interval and DNA content of liver cells in rats by image analysis  
*Fa Yi Xue Za Zhi*,16(2), 68- 69, 2000
- Lodish H.:** Molecular cell biology, 4<sup>th</sup> edition, W. H. Freeman & Co., 2000
- Madea B.:** Is there recent progress in the estimation of the postmortem interval by means of thanatochemistry?, *Forensic Sci. Int.*, 151(2-3), 139-149, 2005
- Nunno N.D., Constantinides F.:** What is the best sample for determining the early postmortem period by on-the-spot flow cytometry?, *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 23(2), 173-180, 2002
- Oberhammer, F.:** Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation, *The EMBO Journal*, 12(9), 3679–3684, 1993
- Průša R.:** Multimediální učebnice DNA diagnostiky, 2. lékařská fakulta UK, Praha 1998, dostupné z: <http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/>
- Raclavský V.:** Metody molekulární genetiky, Olomouc, 2003  
dostupné z: <http://biologie.upol.cz/metody/>
- Sabucedo A.J., Furton K.G.:** Estimation of postmortem interval using the protein marker cardiac Troponin I, *Forensic Sci. Int.*, 134(1), 11-6, 2003

- Schoning, P., Strafass A.C.:** Postmortem biochemical changes in canine vitreous humour, *J. Forensic Sci.*, 25(1), 53-9, 1980
- Stevens A., Lowe J.S.:** Human histology, 3<sup>rd</sup> edition, Elsevier, 2005
- Strachan T.:** Human Molecular Genetics 2, BIOS Scientific Publishers Ltd, 1999
- Wilkinson D.G.:** In Situ Hybridization: A Practical Approach, Oxford University Press, 1998
- Xiao J.H.:** A study on the relationship between the degradation of protein and the postmortem interval,  
Preliminary Medicine College of Sun Yat- Sen University, China, 2005
- Yakovlev, A.G.:** A Role of the Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-dependent Endonuclease in Apoptosis and Its Inhibition by Poly(ADP-ribose) Polymerase, *J. Biol. Chem.*, 275(28), 21302-21308, 2000
- Zhivotosky B., Orrenius S.:** Assessment of Apoptosis and Necrosis by DNA Fragmentation and Morphological Criteria  
Current Protocols in Cell Biology, John Wiley & Sons, 2001