

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Alternativy bisulfitací reakce pro detekci metylace cytosinu

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Eliška Remešová
Studijní program:	N0512A130009 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.
Rok:	2024

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Pro generování hypotéz při vyhodnocení části 4.2 byl použit také ChatGPT.

Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 20. 4. 2024

.....
Podpis studenta

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli, prof. Mgr. Jiřímu Drábkovi, Ph.D. za vstřícné a odborné vedení při vypracování mé diplomové práce. Ráda bych též poděkovala Mgr. Lucii Kotkové za cenné rady a pomocnou ruku zejména v rámci experimentální části diplomové práce. Poděkování patří také Ing. Rastislavu Slavkovskému, Ph. D. za výpomoc při analýze primárních sekvenačních výsledků.

Veškeré obrázky v diplomové práci byly vytvořeny v aplikaci BioRender.

Práce byla vypracována na základě grantů LM2023033, LM2023053, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_026/0008448, EF16_013/0001674, LM2023067, LX22NPO5102, TN02000109, CZ.02.01.01/00/22_008/0004644 a IGA LF UP 2023_006

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Eliška Remešová
Název práce	Alternativy bisulfitační reakce pro detekci metylace cytosinu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	prof. Mgr. Jiří Drábek Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024
Abstrakt	<p>Epigenetika je vědní podobor genetiky zabývající se regulací genové exprese a propagací genetické informace organismu v reakci na změny prostředí. K těmto změnám dochází bez ovlivnění primární struktury DNA a mohou být děděny z buňky na buňku i z generace na generaci. Mezi primární epigenetické regulační mechanismy řadíme metylaci DNA, což je reverzibilní dědičný proces kovalentního navázání metylové skupiny na molekulu nukleové kyseliny, který je společný pro všechny organismy. V rámci mnoha studií bylo zjištěno, že metylace DNA na specifických lokusech může sloužit jako potenciální biomarker stárnutí a může být užitečným nástrojem pro stanovení věku zůstavitele stopy při vyšetřování kriminálních případů.</p> <p>Cílem teoretické části práce bylo vypracovat literární rešerši na téma epigenetických modifikací, metylace cytosinu, biomarkerů stárnutí a metod analýzy metylace DNA. Cílem praktické části pak bylo připravit vlastní metylované a nemetylované standardy, zavést do laboratorní praxe metodu NEBNext a její výsledky porovnat s bisulfitační reakcí, která se již v laboratoři běžně používá a optimalizovat metodu BisQuE k vyhodnocení účinnosti konverze vzorků zpracovaných bisulfitační i alternativní metodou.</p> <p>V rámci experimentální části práce byl úspěšně připraven metylovaný i nemetylovaný standard. Byla také provedena metoda NEBNext na sadě patientských vzorků i standardů. Pomocí této metody se podařilo stanovit věk s přesností až 5 let, avšak standardy poukazovaly na nedostatečnou účinnost konverze DNA. Při provedení metody také docházelo k vysokým ztrátám DNA (až 97 %), které byly vyšší než ztráty u bisulfitové konverze (90 %). Pro vyhodnocení účinnosti konverze byla následně optimalizována nová metoda BisQuE, pomocí které byla změřena účinnost konverze jako 100% u bisulfitace a až 99,96% u NEBNextu. Získané výsledky nepotvrdily, že NEBNext je k DNA šetrnější než bisulfitační konverze.</p>
Klíčová slova	predikce věku, metylace cytosinu, bisulfitová konverze, NEBNext, BisQuE
Počet stran	81
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Eliška Remešová
Title	Bisulfite reaction alternatives for cytosine methylation detection
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	prof. Mgr. Jiří Drábek Ph.D.
The year of presentation	2024
Abstract	<p>Epigenetics is a subfield of genetics studying regulation of gene expression and propagation of genetic information in response to environmental changes. These changes occur without affecting the primary DNA structure and can be inherited from cell to cell and from generation to generation. The primary epigenetic regulatory mechanisms include DNA methylation, which is a reversible heritable process of covalently attaching a methyl group to a nucleic acid molecule that is common to all organisms. Previous studies have found that DNA methylation at specific loci can serve as a potential biomarker of aging and can be a useful tool for determining the age of the DNA originator in criminal investigations.</p> <p>The aim of the theoretical part of the thesis was to summarize the literature about epigenetic modifications, cytosine methylation, biomarkers of aging and methods of DNA methylation analysis. The aim of the practical part was to prepare our own methylated and unmethylated standards, to introduce the NEBNext method into laboratory practice and compare its results with the bisulfite reaction that is already commonly used in the laboratory and to optimize the BisQuE method to evaluate the conversion efficiency of samples processed by the bisulfite and alternative methods.</p> <p>Both methylated and unmethylated standards were successfully prepared in the experimental part of the work. The NEBNext method was also performed on a set of patient samples and standards. Using this method, the age could be determined with an accuracy of up to 5 years, but the standards showed an insufficient efficiency of DNA conversion. The method also resulted in high DNA losses (up to 97%), which were higher than those of bisulfite conversion (90%). For the assessment of conversion efficiency, a novel method called BisQuE was subsequently optimized, through which a conversion efficiency of 100% was measured for bisulfite conversion and up to 99.96% for NEBNext. The results obtained did not confirm that NEBNext is more DNA friendly than bisulfite conversion.</p>
Keywords	age prediction, cytosine methylation, bisulfite conversion, NEBNext, BisQuE
Number of pages	81
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	ÚVOD.....	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Úvod do epigenetiky	2
2.2	Biomarkery stárnutí	3
2.3	Metylace a demethylace DNA	5
2.3.1	Vliv věku na metylační procesy v DNA	8
2.3.2	Epigenetické hodiny	10
2.3.3	Využití metylace DNA pro forenzní účely.....	12
2.4	Metody analýzy metylace DNA.....	14
2.4.1	Chemická konverze pomocí bisulfitu sodného	14
2.4.2	Konverze s využitím specifických enzymatických reakcí	15
2.4.3	Další způsoby analýzy metylace	18
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
3.1	Přístrojové vybavení	21
3.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	22
3.3	Metody	24
3.3.1	Příprava standardů.....	24
3.3.2	Kvantifikace DNA	26
3.3.3	Metyl-specifická PCR.....	27
3.3.4	Bisulfitová konverze	27
3.3.5	Enzymatická konverze	29
3.3.6	Kvantitativní polymerasová řetězová reakce (qPCR)	32
3.3.7	Digitální elektroforéza.....	33
3.3.8	Přečištění vzorků	33
3.3.9	Příprava knihovny	34
3.3.10	Sekvenování a vyhodnocení sekvenačních výsledků.....	35
3.3.11	Evaluace konverze DNA.....	37
4	VÝSLEDKY	39
4.1	Výsledky přípravy standardů	39
4.2	Výsledky bisulfitové konverze.....	40
4.3	Výsledky NEBNext	43
4.4	Výsledky metody BisQuE.....	48
4.4.1	Optimalizace metody	48
4.4.2	Evaluace konverze	51
4.4.3	Evaluace konverze - porovnání amplifikačních přístupů	59
5	DISKUSE.....	63

6	ZÁVĚR.....	68
7	LITERATURA	70
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	78
9	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	79
10	SEZNAM TABULEK	80

Cíle práce

Cílem teoretické části práce bylo vypracovat literární rešerši na téma epigenetických modifikací, metylace cytosinu, biomarkerů stárnutí a metod analýzy metylace DNA. Cílem praktické části pak bylo připravit vlastní metylované a nemetylované standardy, zavést do laboratorní praxe metodu NEBNext a její výsledky porovnat s bisulfitační reakcí, která se již v laboratoři běžně používá a optimalizovat metodu BisQuE k vyhodnocení účinnosti konverze vzorků zpracovaných bisulfitační i alternativní metodou.

1 ÚVOD

Epigenetické změny v DNA jsou zásadní pro regulaci genové exprese v buňkách a souvisí s propagací genetické informace v reakci na změny prostředí. Působením epigenetických jevů v organismu dochází ke změnám struktury i funkce deoxyribonukleové kyseliny, které nejsou způsobeny změnou sekvence nukleotidů (Moore *et al.*, 2013). Tím se podílí na procesech diferenciaci, morfogeneze a adaptivity a variability organismů (Halušková, 2009). Mezi epigenetické změny řadíme kovalentní modifikace DNA, jako je metylace DNA, a post-translační modifikaci histonů, jež se podílí na modelaci chromatinu.

Významným epigenetickým regulačním mechanismem je metylace cytosinu, jež byla prvně pozorována v roce 1948 při experimentu využívajícím papírovou chromatografii (Hotchkiss, 1948). Methylace je reverzibilní proces kovalentního navázání metylové skupiny z S-adenosyl-L-metioninu na cytosin pomocí rodiny enzymů zvané DNA metyltransferasy. Tento proces je společný pro všechny organismy včetně bakterií, rostlin a savců, přičemž jeho patologické rozvinutí může vést k závažným imunitním, onkologickým, neurologickým, genetickým i jiným poruchám (Jin & Robertson, 2013; Li *et al.*, 2021; Rasmi *et al.*, 2022; Younesian *et al.*, 2022). Metylační změny ve specifických oblastech DNA bohatých na cytosin mohou souviset s chronologickým věkem a mohou být tedy využity jako potenciální biomarkery stárnutí (Christensen *et al.*, 2009) či jako důležitý nástroj k odhadu věku z tělních tekutin při vyšetřování kriminálních případů (Kotková & Drábek, 2023; Rana, 2018; Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015).

V rámci teoretické části diplomové práce jsem shrnula aktuální poznatky v oblasti epigenetických hodin a biomarkerů stárnutí a dále metylačních změn v DNA, jejich analýzy a využití v oblasti forenzních věd. V rámci experimentální části jsem se neprve zaměřila na přípravu nemetylovaného a metylovaného standardu pro další experimenty. Dále jsem se také soustředila na bisulfitovou konverzi, jež je zlatým standardem v oblasti analýzy metylačních změn a na zavedení alternativní metody NEBNext, přičemž výsledky obou metod byly posléze porovnány. Pro prozkoumání falešně pozitivních výsledků byla následně optimalizována metoda BisQuE, která umožňuje vyhodnotit účinnost konverze nemetylovaných cytosinů na uracil po bisulfitací reakci a účinnost konverze metylovaných cytosinů na karboxycytosin po NEBNext reakci.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Úvod do epigenetiky

Epigenetika je nástavba genetiky úzce související s regulací genové exprese a propagací genetické informace organismu v reakci na změny prostředí. Zabývá se změnami struktury i funkce deoxyribonukleové kyseliny, které nejsou způsobeny změnou sekvence nukleotidů. Epigenetické jevy přitom mohou být přenášeny z buňky na buňku i z generace na generaci (Moore *et al.*, 2013).

Ačkoli prakticky všechny buňky v organismu obsahují stejnou genetickou informaci, geny jsou exprimovány rozdílně, mají odlišné expresní profily v jednotlivých typech buněk. Epigenetické změny se přitom zásadně podílí na regulaci genové exprese v rámci transkripce, translace a post-translačních modifikací. Tímto jsou zapojeny do procesů diferenciaci, morfogeneze a adaptivity a variability organismů (Halušková, 2009). Jejich patologie se projevuje potlačením činnosti genů zapojených do opravných procesů nukleových kyselin a narušením kontrolních bodů buněčného cyklu a systému programované buněčné smrti, čímž mohou vést až k rozvoji autoimunitních chorob (Surace & Hedrich, 2019).

Mezi epigenetické změny patří kovalentní modifikace DNA, jako je metylace DNA a post-translační modifikace histonů, jež se podílí na modelaci chromatinu. Studie v posledních desetiletích ukazují, že zejména metylační změny ve specifických oblastech DNA bohatých na cytosin mohou souviset s chronologickým věkem a mohou být tedy využity i jako potenciální biomarkery stárnutí (Christensen *et al.*, 2009).

2.2 Biomarkery stárnutí

Stárnutí je komplexní a přirozený proces postupného nevratného snižování vitality a funkční kapacity organismu. Jedná se o proces univerzální pro všechny organismy, jenž ovlivňuje jejich fyziologický stav na molekulární, buněčné i tkáňové úrovni. Stáří jedince je též významným rizikovým faktorem pro spoustu závažných chorob, jako jsou například kardiovaskulární a onkologická onemocnění, cukrovka, neurologická onemocnění (Wagner *et al.*, 2016). Rychlost stárnutí se přitom může významně lišit v závislosti na pohlaví, životním stylu a životosprávě, genetických predispozicích a dalších faktorech (Cowell *et al.*, 1994; Olivetti *et al.*, 1995). Veškeré faktory přitom doposud nebyly plně prozkoumány.

Biologické znaky či ukazatele, které slouží ke sledování procesů stárnutí v lidském těle, nazýváme biomarkery stárnutí. Mohou poskytovat informace o biologickém věku organismu a aktuálním stavu jeho tělesných funkcí, stejně tak mohou být užitečné pro odhad rychlosti stárnutí a predikci výskytu zdravotních komplikací či smrti. Biomarkery stárnutí pak mohou být užitečné také pro studium mechanismů stárnutí, klinickou diagnostiku nemocí spojených se stárnutím a vývoj strategií pro zlepšení zdraví a prodloužení života (Moqri *et al.*, 2023).

Pro zavedení nového biomarkeru stárnutí do praxe je stanoveno několik kritérií. Mezi tato kritéria řadíme relevanci pro stárnutí, minimální invazivitu vyšetření a spolehlivost při měření s nízkou technickou variabilitou. Biomarker by měl také odpovídat na funkční aspekty stárnutí. Zároveň by měl být uplatnitelný pro širokou populaci. Před zavedením do laboratorní praxe pak musí biomarker projít analytickou a klinickou validací pro zajištění spolehlivosti (Moqri *et al.*, 2023).

Biomarkery stárnutí můžeme rozdělit do dvou základních skupin, a to na jednoduché a složené. Jednoduché biomarkery sledují jeden parametr či případně úzkou skupinu parametrů, které jsou asociovány s věkem. Mohou být dále děleny na a) molekulární, jež vychází ze znaků stárnutí na úrovni buněk, nukleových kyselin či proteinů, b) funkční, které popisují snižující se funkční kapacitu v průběhu stárnutí a c) antropometrické, jež se zaměřují na strukturální změny tělesné konstituce.

Molekulární biomarkery vychází obvykle z měřitelných laboratorních parametrů, sledovaných ve vzorcích krve, slin, spermatu či jiných tělních tekutin. Do této skupiny

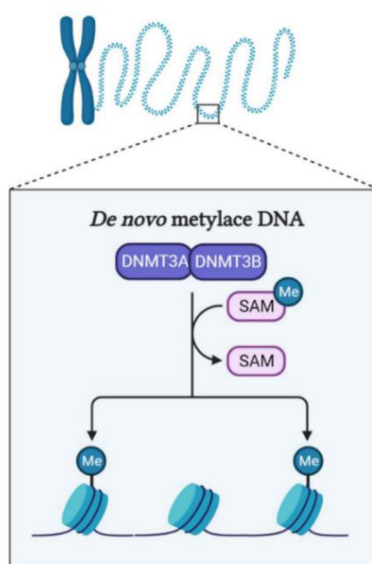
můžeme zařadit poškození nukleové kyseliny, zvyšující pravděpodobnost časného úmrtí (Whittemore *et al.*, 2019), zkracování telomer, jež vede k postupné destabilizaci dvoušroubovice DNA (Shay, 2018), poruchy homeostázy proteinů, mitochondriální dysfunkce, vyčerpání kmenových buněk a další. Důležitým molekulárním parametrem jsou také epigenetické změny v DNA, jež budou blíže popsány v následujících kapitolách. Do skupiny funkčních, neboli fyziologických markerů řadíme obvykle parametry z běžné klinické praxe, jež souvisí s rychlostí stárnutí, jako je například maximální tepová frekvence či vitální kapacita plic (Boss & Seegmiller, 1981). Antropometrické neboli anatomické faktory pak zohledňují aktuální stav jedince. Do této skupiny je možné zařadit například množství a rozložení tělesného tuku, svalové hmoty či výšku postavy (Stoudt, 1981).

Složené biomarkery představují vysoce komplexní způsob hodnocení biologického věku. Vznikají kombinací rozsáhlých souborů multiparametrických dat, jež jsou statisticky vyhodnoceny pomocí počítačových algoritmů či umělé inteligence. Skupinu složených markerů můžeme rozdělit na epigenetické hodiny, jež fungují na principu odhadu biologického věku na základě metylace na CpG ostrůvcích DNA a takzvané -omics metody, jež vychází z měření metabolomu, proteomu, transkriptomu či jiných souborů dějů či látek, jež se vyskytují v organismu v daném čase (Rivero-Segura *et al.*, 2020). Tyto metody pak dle konkrétního zaměření rozdělujeme na genomické, transkriptomické, proteomické a další (Borský *et al.*, 2023).

2.3 Metylace a demethylace DNA

Mezi hlavní epigenetické regulační mechanismy genové exprese řadíme metylaci DNA. Jedná se o reverzibilní dědičný proces kovalentního navázání metylové skupiny na molekulu DNA, který je společný pro všechny organismy včetně bakterií, rostlin a savců. Methylace DNA byla prvně objevena v polovině minulého století v savcích buňkách. S využitím papírové chromatografie pak byla v roce 1948 poprvé pozorována přítomnost metylovaného cytosinu (Hotchkiss, 1948). Ve druhé polovině minulého století pak bylo několika studiemi prokázáno, že se methylace DNA podílí na regulaci genů a diferenciaci buněk (Compere & Palmiter, 1981; Holliday & Pugh, 1975).

Proces methylace DNA je regulován rodinou enzymů zvanou DNA methyltransferasy (DNMT), které jsou klíčové pro růst a vývoj všech savců a udržení stability genomu. Patologická exprese těchto enzymů může znamenat rozvoj různých forem onemocnění. Můžeme zde zařadit například onemocnění autoimunitní (Li *et al.*, 2021), onkologická (Jin & Robertson, 2013), dále neurologická, jako je například Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, amyotrofická laterální skleróza (Rasmi *et al.*, 2022; Younesian *et al.*, 2022), genetické poruchy, metabolické poruchy a další. Primární rolí DNMT v organismu je přenos metylové skupiny na cílové místo na rozvinutém chromatinovém vlákne DNA pod kontrolou opravných DNA mechanismů, donorem metylové skupiny je přítom S-adenosyl-L-metionin (SAM) (obrázek 1).



Obrázek 1 Schéma *de novo* methylace za účasti DNMT3A a DNMT3B. Metylová skupina je přenesena z S-adenosyl-L-metioninu na nukleotidové vlákno.

U savců byly identifikovány celkem čtyři DNA metyltransferasy. DNA metyltransferasa 1 se podílí na uchování metylace DNA během procesu replikace pomocí kopírování metylačního vzoru mateřského vlákna na vlákno nově syntetizované, neboli dceřiné (Kim *et al.*, 2008). DNA metyltransferasa 2 má význam zejména jako tRNA transferasa katalyzující metylaci na 38. pozici v tRNA^{Asp}_{GUC} spíše než v metylaci DNA (Gibney & Nolan, 2010). DNA metyltransferasa 3a a DNA metyltransferasa 3b cílí na nemetylované CpG dinukleotidy a podílejí se tedy na *de novo* metylaci s funkcí v gametogenezi a ranné embryogenezi. Spolupracují také s DNA metyltransferasou 1 na uchování metylačního vzoru během replikace (Weber & Schübeler, 2007). U člověka byl popsán také výskyt DNA metyltransferasy 3-like; tato metyltransferasa však na rozdíl od ostatních nenese enzymatickou aktivitu (Kareta *et al.*, 2006) a podílí se pouze na regulaci *de novo* metylace stimulací aktivity DNA metyltransferasy 3a a DNA metyltransferasy 3b v zárodečných buňkách (Veland *et al.*, 2019). Exprese *DNMT* a genů pro ten-eleven translokační enzymy (*TET1*, *TET2*, *TET3*) se liší v závislosti na konkrétní tkáni; ve studiích distribuce 5-hydroxymetylcytosinu (5hmC) a 5-metylcytosinu (5mC) v myších a lidských tkáních byla prokázána vyšší exprese v mozkové tkáni (Ito *et al.*, 2010; Khare *et al.*, 2012).

Ačkoliv mohou být teoreticky metylovány všechny cytosiny v DNA, v lidské DNA dochází k metylaci přibližně u tři procent cytosinů (Nafee *et al.*, 2008). Nejčastěji dochází k navázání metylové skupiny v oblasti promotoru, skupina se přitom váže na pátý uhlík v dinukleotidu cytosin-fosfát-guanin (CpG). Tyto dinukleotidy se v oblasti genomu vyskytují v nízké frekvenci kromě takzvaných CpG ostrůvků, jež jsou neuspořádaně rozmístěné na DNA sekvenci (Babenko *et al.*, 2017). Dřívější studie poukázovaly na to, že se CpG ostrůvky vyskytují především v promotorové oblasti DNA (Baylin, 2005; Doerfler, 1981), novější studie však toto tvrzení vyvrací zjištěním, že se přibližně polovina CpG ostrůvků nenachází v oblasti promotoru, nýbrž v intragenových či intergenových oblastech a mohou sloužit také jako markery počátku transkripce (Illingworth *et al.*, 2008). U obratlovců je metylováno více než 80 % CpG dinukleotidů mimo CpG ostrůvky, zatímco CpG dinukleotidy obsažené v CpG ostrůvcích vykazují nízkou úroveň metylace (Miranda & Jones, 2007). Navázání metylového zbytku do oblasti promotoru pak může vést k transkripčnímu umlčení prostřednictvím blokace vazby transkripčních faktorů na sekvenci DNA (Curradi *et al.*, 2002).

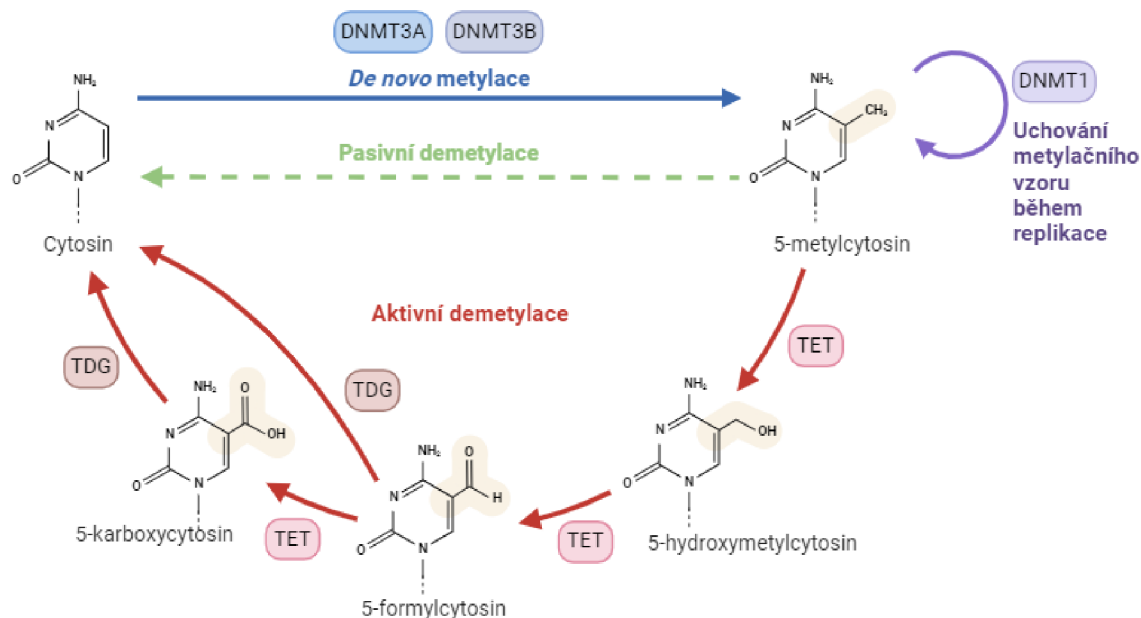
Kromě C⁵-methyl cytosinu mohou vznikat dvě další metylované báze, jmenovitě N⁶-methyladenin (m⁶A) a nedávno objevená minoritní báze N⁴-methylcytosin (m⁴C). Tyto modifikované báze se podílejí na ochraně bakteriální DNA před účinkem specifických endonukleas prostřednictvím hostitelově specifického restriktivně-modifikačního systému, který je považován za obranný mechanismus proti bakteriofágové infekci. Role m⁶A zahrnují například regulaci virulence a kontrolu mnoha funkcí bakteriální DNA, jako je replikace, oprava, exprese a transpozice DNA (Ratel *et al.*, 2006). Přítomnost N⁶-methyladeninu byla v nedávné době potvrzena v lidském genomu, jeho pokles se přitom může projevit tumorogenezi (Xiao *et al.*, 2018). Demethylace DNA je děj, kdy dochází k odstranění metylové skupiny z 5-methylcytosinu při potřebě organismu modifikovat genovou expresi. Jedná se o klíčový proces pro embryogenezi, gametogenezi, mechanismy percepce bolesti a další (Pan *et al.*, 2016). Může jít o pasivní, spontánní cestu nebo o cestu aktivní, za účasti enzymů.

K demethylaci 5mC zbytků dochází spontánně při deaminaci 5mC na thymin nebo na základě opravy daného regionu genomu obsahujícího 5mC (Unnikrishnan *et al.*, 2019). Při aktivní cestě demethylace je metylovaná skupina cytosinu modifikována a poté odstraněna činností ten-eleven translokační enzymů, které jsou součástí rodiny translokačních metylcytosin dioxygenas.

Rodina TET proteinů zahrnuje tři proteiny (TET1, TET2 a TET3), které katalyzují oxidaci metylové skupiny cytosinu na 5hmC (Tan & Shi, 2012). Všechny TET proteiny obsahují konzervovanou doménu, sestavenou z dvoušroubovicového beta-helixu (DSBH), doménu bohatou na cystein a vazebná místa pro kofaktory Fe(II) a 2-oxoglutarát, které společně formují katalytické místo. Studie struktury TET proteinů naznačují, že tato katalytická část váže přednostně cytosiny v dinukleotidu CpG a neinteraguje s okolními bázemi DNA (Hashimoto *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2013). Kromě této katalytické domény mají TET1 a TET3 N-terminální doménu zinkového prstu, jež váže DNA (Zhang *et al.*, 2010).

Během aktivní cesty demethylace dochází nejprve k hydroxylaci DNA 5-methylcytosinu na hydroxymethylcytosin a dále k oxidaci 5hmC na 5-karboxycytosin (5caC) přes 5-formylcytosin (5fC). 5fC a 5caC mohou být z DNA sekvence odstraněny pomocí mechanismu excise dané DNA báze a nahrazeny cytosinem (He *et al.*, 2011). Bylo zjištěno, že 5-hydroxymethylcytosin může mít v genové regulaci roli sám o sobě

(Kriaucionis & Heintz, 2009; Tahiliani *et al.*, 2009), zejména v nervové soustavě (Cheng *et al.*, 2015). Takto modifikovaná báze může být také odstraněna mechanismem deaminace na 5-hydroxymetylcytosin pomocí cytosindeaminasy. Aktivní i pasivní cesta demethylace je spolu s *de novo* metylací pro přehlednost vyobrazena na obrázku 2.



Obrázek 2 Souhrnné schéma procesu *de novo* metylace za účasti DNMT3A a DNMT3B, uchování metylačního vzoru za účasti enzymu DNMT1, pasivní demethylace 5-metylcytosinu na cytosin a aktivní demethylace za účasti enzymů TET a thymin-DNA-glykosylasy (TDG).

2.3.1 Vliv věku na metylační procesy v DNA

Stárnutí je způsobeno řadou komplexních a vzájemně propojených faktorů. Mezi tyto faktory řadíme oxidativní poškození DNA, vyčerpání samoobnovujících se kmenových buněk, mutace mitochondriálního a jaderného genomu, hromadění defektů v organismu, zkrácení telomer a další procesy (Kirkwood, 2005). Jakákoliv změna v expresi enzymů podílejících se na metylaci DNA přitom může mít velké následky pro celý organismus. Velkým tématem je proto také vliv prostředí a věku na metylaci DNA, expresi DNA methyltransferas a TET enzymů.

Literatura datující se od 60. let 20. století poukazuje na skutečnost, že měnící se věk koreluje také se změnou úrovně metylace DNA v genomu (Ahuja *et al.*, 1998; Berdyshev *et al.*, 1967; Hernandez *et al.*, 2011; Christensen *et al.*, 2009; Teschendorff *et al.*, 2010). Vůbec první důkazy korelace mezi věkem a DNA metylací pocházejí ze studií na vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC), kdy byl měřen obsah 5mC v hydrolyzované DNA. V roce 1988 zahájil americký Mezinárodní institut stárnutí (National Institute of Aging) program s cílem identifikovat biomarkery

související s věkem v modelových organismech (Baker & Sprott, 1988). V novém tisíciletí, po dokončení projektu Human Genome Organisation (HUGO) s cílem mapování lidského genomu, vzrůstal také počet výzkumů na lidských tkáních. V této době bylo ve studiích na myších, hlodavcích i lidských tkáních zjištěno, že úroveň 5mC v DNA klesá s věkem, což vedlo k hypotéze, že se vzrůstajícím biologickým věkem dochází ke globální hypometylaci DNA (Wilson *et al.*, 1987). Tato hypotéza byla zkoumána množstvím následujících studií, přičemž bylo možné pozorovat v různých případech jak hypometylaci, tak i hypermetylaci DNA či případně žádné změny v globálním metylomu organismu (Unnikrishnan *et al.*, 2018).

Velký pokrok ve studiu metylace DNA byl zaznamenán při využití hydrogensířičitanové (bisulfitové) konverze, která je dnes již rutinní metodou při epigenetických studiích. Použití hydrogensířičitanu sodného vede ke specifické deaminaci nemetylovaného cytosinu na uracil. Umožňuje tím odlišení nemetylovaných od metylovaných cytosinů, které zůstávají nezměněny. Bisulfitovou konverzi po několika mezikrocích následuje sekvenování DNA. Při sekvenování se v současné době již ustupuje od Sangerovy metody (Slatko *et al.*, 2018) a přechází se buď k metodám na bázi oligonukleotidových sond (k DNA chipům) nebo k sekvenačním metodám nové generace (NGS nebo také MPS, Massively Parallel Sequencing). NGS metody nám umožňují sledovat metylaci cytosinů i v jiných než CpG (tzv. CpH) metylačních místech. Podchycení CpG míst se liší v závislosti na použité technologii. I když nedochází obecně ke snižování množství 5mC v celém genomu s chronologickým věkem, je dokázáno, že v návaznosti na věk dochází ke změnám v metylaci DNA.

Současné studie na myších i lidských buňkách ukazují, že molekulární biomarkery stárnutí založené na metylaci splňují potřebná kritéria, tj. vztahují se na všechny zdroje DNA (buňky, tkáně, orgány) a na celé věkové spektrum od prenatální tkáně po tkáně osob dožívajících se vysokého věku (Horvath, 2013). Od svého objevu přinesly tyto biomarkery odpovědi na otázky týkající se medicíny, biodemografie, endokrinologie, životosprávy apod., přinesly však také spoustu dalších navazujících otázek týkajících se rozdílu mezi epigeneticky odhadovaným věkem a chronologickým věkem jedince. Stejně tak přináší další otázky o vlivu stresových faktorů a prostředí na epigenetický profil (Horvath & Raj, 2018).

2.3.2 Epigenetické hodiny

Využití oligonukleotidových sond a nových sekvenačních metod umožňujících specifikovat CpG místa v lidském genomu pomohlo specifikovat změny metylačního profilu DNA v souvislosti s nemocemi nebo stárnutím. Studie z počátku druhého tisíciletí (Bjornsson *et al.*, 2008; Christensen *et al.*, 2009; Teschendorff *et al.*, 2010) ukázaly, že úroveň metylace na specifických místech v lidském genomu se mění v souvislosti s věkem. To bylo potvrzeno studií Bocklandta *et al.* na 34 mužích, kdy byla nalezena korelace s věkem pro 88 CpG míst v 80 genech v DNA pocházející ze slin (Bocklandt *et al.*, 2011). Pro vytvoření spolehlivých epigenetických hodin je třeba vzít v potaz také tkáňovou specifitu metylace DNA. V předchozích studiích bylo prokázáno, že k metylaci DNA dochází v různé míře specificky jak mezi druhy, tak i v závislosti na konkrétní tkáni (Gama-Sosa *et al.*, 1983). Dále byly zkoumány takzvané tkáňově specificky diferenciatně metylované regiony (T-DMRs) a vývojově specifické regiony (DS-DMRs), jež jsou distribuovány zejména v promotorových oblastech v různé míře, jak v závislosti na konkrétní tkáni, tak s ohledem na stáří jedince a jeho fyzický stav (Liang *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2023). Jejich metylace či demethylace vede k dynamickým změnám genové exprese.

Tato zjištění vedla k dalším výzkumům specifických CpG míst korelujících s biologickým věkem. Na jejich základě byl započat vývoj bioinformatických a statistických nástrojů, jež umožňovaly těžení DNA metylačních dat a hledání nejlepšího epigenetického modelu pro věk. Pomocí této metodologie bylo vyvinuto několik epigenetických hodin, které předpovídají chronologický věk na základě metylace ve 3 až 513 místech CpG v DNA z vybraných lidských tkání či krve. Epigenetické hodiny jsou definovány jako biochemický test, který lze použít ke zjištění věku na základě sledování změn metylace v molekulách DNA (Duan *et al.*, 2022).

V první generaci vývoje epigenetických hodin byly vyvinuty čtyři různé metody odhadu chronologického věku z lidské tkáně. Nejpoužívanější metoda byla vyvinuta v roce 2013 (Horvath, 2013). Tyto epigenetické hodiny využívaly údaje o metylaci DNA na 8 000 vzorcích z 82 Illumina DNA metylačních datasetů získané z veřejně dostupných souborů dat pro 51 typů lidských tkání a buněk. Ačkoliv některá CpG místa vykazovala jednotlivě pouze slabou korelaci s věkem, konkrétní set CpG míst předpovídal chronologický věk s vysokou přesností. Na základě 353 CpG míst předpovídají tyto

hodiny chronologický věk s průměrnou absolutní odchylkou 3,6 let. Další epigenetické hodiny byly vyvinuty z dat metylace DNA z krve. Tento model je založen na 71 CpG místech a vykazuje vysokou spjitost s chronologickým věkem s odchylkou 4,9 let (Hannum *et al.*, 2013), jejich predikční schopnost však klesá s aplikací na jiné tkáňové vzorky. Přesnost epigenetických hodin vyvinutých Horvathem *et al.* není změnou tkáně příliš ovlivněna s výjimkou kosterního svalstva, srdce a prsní tkáně (Horvath, 2013). Epigenetické hodiny, které jsou schopny predikovat věk z krve s využitím pouhých tří CpG míst, byly vyvinuty skupinou Weidner *et al.* Dataset byl nejprve redukován na 102 CpG míst, které byly spojovány s věkem. Dosáhli průměrné absolutní odchylky 3,3 let. Z tohoto datasetu byla nakonec vybrána tři místa lokalizována na genech *ITGA2B*, *ASPA* a *PDE4C*, jež mohou být použita pro odhad chronologického věku za pomoci bisulfitového pyrosekvenování. Po aplikaci těchto epigenetických hodin u 151 krevních vzorků se podařilo dosáhnout průměrné absolutní odchylky méně než 5 let (Weidner *et al.*, 2014).

Horvathova skupina se také zaměřila na vývoj epigenetických hodin, jež by lépe předpovídaly biologický věk začleněním klinických aspektů (např. hladina albuminu, kreatininu, glukosy apod.), aby mohly zachytit také změny ve zdravotním stavu. Výsledné hodiny nazvané DNAm PhenoAge využívají 513 CpG míst, přičemž sdílely stejných 41 CpG míst s Horvathovými hodinami a 6 CpG míst s Hannumovými epigenetickými hodinami. DNAm PhenoAge byl vyvinut na datech z plné krve. Výsledky prokazují, že v každé testované tkáni silně koreluje s věkem a výrazně překonává předchozí měření v předpovědi stárnutí a mortality.

Pro přehlednost byly parametry jednotlivých epigenetických hodin shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1 Epigenetické hodiny pro určení věku (Unnikrishnan *et al.*, 2019)

Epigenetické hodiny	Tkáň	Identifikovaná CpG místa	Přesnost určení věku
Horvath (2013)	Krev, mozek, bukální buňky, srdce, játra, plíce, placenta, tlusté střevo, CD4 buňky, sliny, ledviny, svalová a prsní tkáň, děložní a tuková tkáň, imortalizované B buňky	353	$r^2 = 0,96$
Hannum <i>et al.</i> (2013)	Krev	71	$r^2 = 0,91$
Weidner <i>et al.</i> (2014)	Krev	3	$r^2 = 0,98$
PhenoAge, Levine <i>et al.</i> (2018)	Krev	513	$r^2 = 0,92$

Kromě epigenetických hodin se aktuálně k odhadu potenciálního biologického věku využívá také délka telomer. Takový odhad věku spočívá v měření délky ochranných struktur na koncích chromozomů, zvaných telomery. Tyto struktury sestávají z opakující se sekvence nukleotidů TTAGGG. S každým buněčným dělením se přitom telomery zkracují, což je spojováno s procesem stárnutí (Benetos *et al.*, 2001; Harley *et al.*, 1990). Analýza délky telomer umožňuje odhadnout biologický věk jedince, přičemž zkrácené telomery mohou indikovat vyšší biologický věk a potenciální souvislosti s podlomeným zdravím a procesem stárnutí (Karlsson *et al.*, 2008). Dále zde řadíme odhady založené na transkriptomech, proteomické a metabolické odhady a také kompozitní biomarkery. Epigenetické hodiny se aktuálně jeví jako nejslibnější způsob odhadu biologického věku (Jylhävä *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2016). Stále je však nutné plně prozkoumat potenciál všech uvedených metod.

2.3.3 Využití metylace DNA pro forenzní účely

Forenzní věda využívá při vyšetřování kriminálních případů široké spektrum metod, do kterého řadíme identifikaci tkání a tělních tekutin, profilování pomocí krátkých tandemových repetitivních sekvencí (STR), což jsou tandemově se opakující jednotky repetitivní sekvence specifické pro každého jedince, epigenetické změny v DNA, kam řadíme zejména analýzu

metylačních vzorců a další (Rana, 2018). Jako klíčový důkaz ve fázi vyšetřování se přitom může jevit také stanovení věku, jež nám umožní zúžit výběr potenciálních pachatelů či identifikovat oběť.

Dřívější metody určování věku u zemřelých osob se spoléhaly zejména na morfologické znaky vyskytující se na zubech či částech skeletu. Nynější metody forenzního odhadu věku původce DNA se zaměřují na zejména na využití krvavých skvrn, spermatu či jiných tělních tekutin, jež se často vyskytují právě na místě trestného činu. Epigenetické změny v DNA se přitom ukázaly jako užitečný nástroj zejména pro analýzu věku z krve či spermatu. Za zlatý standard jsou v tomto ohledu považovány metody založené na bisulfitové konverzi, jež navzdory vysokým ztrátám DNA v průběhu reakce umožňuje stanovit věk s vysokou přesností. Například v roce 2019 bylo skupinou Correia Dias *et al.* otestováno 51 vzorků zemřelých, přičemž se podařilo stanovit věk s odchylkou 6,1 let (Correia Dias *et al.*, 2020). Soustředili se přitom na lokusy *ELOVL2*, *FHL2*, *EDARADD*, *PDE4C* a *MIR29B2CHG*, jejichž úroveň metylace byla prokazatelně spojena s chronologickým věkem (Bacalini *et al.*, 2015; Cho *et al.*, 2017; Weidner *et al.*, 2014; Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015). Bisulfitovou konverzi pro stanovení věku původce z krevních vzorků využila například také skupina Bekaert *et al.* Sledovali přitom lokusy *ASPA*, *PDE4C*, *ELOVL2* a *EDARADD* na 206 krevních vzorcích původců o širokém věkovém rozpětí 0-91 let, podařilo se přitom stanovit věk s přesností 3,8 let (Bekaert *et al.*, 2015). Jako užitečné pro stanovení věku se prokázaly také vzorky spermatu; skupině Lee *et al.* se podařilo s pomocí tří CpG míst stanovit věk s přesností 4,7 let (Lee *et al.*, 2015), což bylo také potvrzeno nezávislou studií (Lee *et al.*, 2018). Odhad věku ze spermatu byl proveden také například skupinou Pisarek *et al.*, podařilo se přitom stanovit věk s přesností 5,1 let (Pisarek *et al.*, 2021).

Přesnost stanovení věku klesá se vzrůstajícím věkem jak pro krevní vzorky (Cho *et al.*, 2017; Thong *et al.*, 2017; Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015), tak pro vzorky spermatu. Například ve studii Lee *et al.* bylo dosaženo pro původce DNA ve věku kolem 20 let přesnosti $\pm 2,9$ let, avšak pro jedince starší 50 let byla přesnost snížena na $\pm 7,2$ let (Lee *et al.*, 2018). Tento faktor je proto vzít v potaz také při vyhodnocení výsledků. Přesto však monitorování metylačních změn v DNA poskytuje široké využití a má potenciál se stát důležitým nástrojem při policejních vyšetřováních, identifikacích obětí katastrof a řešení dalších policejních případů (Kotková & Drábek, 2023).

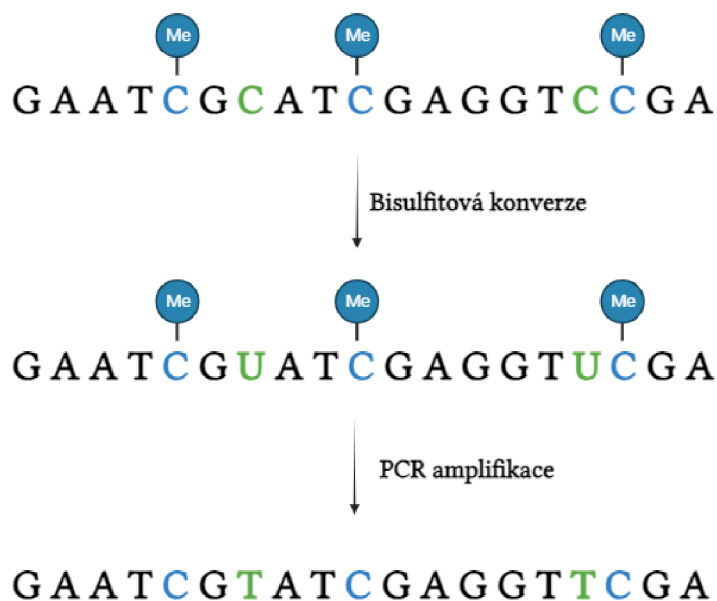
2.4 Metody analýzy metylace DNA

V souvislosti s rozšiřujícím se výzkumem v oblasti epigenetiky a metylace DNA přichází nové technologie a postupy, jež je možné využít pro dekódování metylačních znaků a hledání souvislostí se zdravotním stavem původce. Tyto metody umožňují monitorovat jak známé, tak i neznámé oblasti genomu či konkrétního genu.

Metody můžeme na základě principu rozdělit na chemické, založené na specifických chemických reakcích, kam můžeme zařadit například bisulfitovou konverzi či reakce se sloučeninami osmia, na metody enzymatické včetně specifických restričních enzymů, metody založené na afinitním obohacení a metody přímo detekující metylaci DNA, jako je například jednomolekulové sekvenování v reálném čase (SMRT) nebo nanopórové sekvenování firmy Oxford Nanopore Technologies (Burianová, 2022).

2.4.1 Chemická konverze pomocí bisulfitu sodného

Bisulfitová konverze či bisulfitová modifikace je základní metodou pro mapování metylace DNA, jež byla vyvinuta v 90. letech minulého století. Tato metoda sestává z třístupňové chemické reakce a využívá purifikovanou DNA a bisulfit (hydrogensířičitan) sodný. Prvním krokem je denaturace DNA, neboť modifikace probíhá zvláště na každém vlákně (Frommer *et al.*, 1992). Dalším krokem bisulfitové modifikace je konverze nemetylovaného cytosinu na uracil za pomoci chemické reakce s bisulfitem sodným, zatímco cytosin s navázanou metylovou skupinou zůstává nezměněn (Jones, 2012). Pokud je vzorek následně podroben PCR reakci, 5-metylcytosin je propagován jako cytosin na rozdíl od uracilu, jenž je amplifikován jako tymin (obrázek 3).



Obrázek 3 Modifikace DNA za účasti bisulfitu sodného. Během bisulfitové konverze dochází k přeměně nemetylovaného cytosinu na uracil, zatímco cytosin s navázanou metylovou skupinou zůstává nezměněn. Následuje PCR, při níž je metylovaný cytosin propagován jako cytosin a uracil jako thymin.

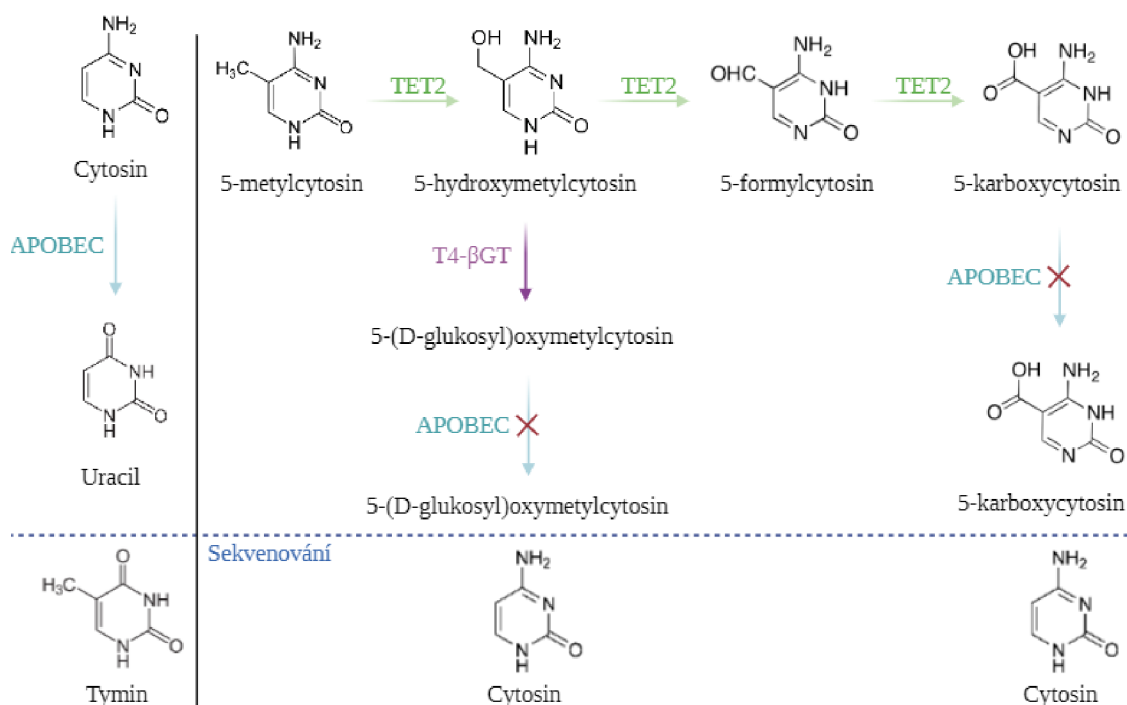
Tato metoda je ideální pro studium známého genu nebo cílové oblasti. Mezi její výhody patří zejména nízká finanční náročnost a vysoká účinnost konverze (Hong & Shin, 2021). Mezi slabé stránky této metody patří možnost získání nekonzistentních výsledků v důsledku degradace templátové DNA po působení hydrogensířčitanu a požadavky na vícenásobná opakování pro potvrzení výsledků (Li & Tollefsbol, 2011). Samotné provedení metody vyžaduje použití vysokých teplot i nízkého pH, které může způsobit depyrimidinaci a následně degradaci DNA (Tanaka & Okamoto, 2007). Tento nedostatek může být kompenzován prodlouženou inkubací za nižších teplot okolo 53 - 60 °C, je zde však zvýšeno riziko nedostatečné konverze cytosinů (Grunau *et al.*, 2001). Kromě toho mohou být nemetylované cytosiny poškozeny neúměrně ve srovnání s 4mC nebo 5hmC, což vede ke tvorbě knihoven s nevyváženým složením nukleotidů, a tedy se zkreslenou reprezentací obsahu guaninu a cytosinu a ke zkresleným výsledkům při stanovení věku původce DNA (Olova *et al.*, 2018).

2.4.2 Konverze s využitím specifických enzymatických reakcí

Navzdory výhodám bisulfitové konverze, jako je vysoké rozlišení na úrovni jedné báze a nízká finanční náročnost, se v běžné laboratorní praxi setkáváme také s nevýhodou této metody, kterou je poškození DNA způsobené bisulfitem sodným, jež má za následek fragmentaci a ztrátu DNA a tím pádem také zkreslená metylační data. Může také dojít k nedostatečné konverzi, která vede k falešně pozitivním výsledkům. V roce 2021

skupina Hong *et al.* publikovala článek, v němž se věnují evaluaci účinnosti konverze DNA s využitím vlastní metody BisQuE, která funguje na principu kvantitativní real-time PCR. Pomocí této metody byla ověřena účinnost konverze DNA u šesti různých souprav pro bisulfitovou konverzi. Byla přitom dosažena účinnost v rozmezí 94,0-99,9 % (Hong & Shin, 2021). Doposud však nebylo publikováno žádné ověření výsledků této metody jinými vědeckými skupinami.

Pro překonání obtíží při bisulfitové konverzi byla vyvinuta metoda enzymatické konverze (obrázek 4), která detekuje 5mC a 5hmC na základě dvou po sobě jdoucích enzymatických reakcí. Využívá přitom přirozeně se vyskytujících enzymů, které jsou schopny rozpoznat metylovanou DNA *in vivo*.



Obrázek 4 Schéma enzymatické konverze. Působením TET2 dochází k přeměně 5-methylcytosinu na meziproducty, jež nemohou být deaminovány APOBEC. Tento proces umožňuje odlišení v sekvenační fázi, kde se prvně metylované cytosiny ukazují jako cytosiny, zatímco nemetylované cytosiny jsou sekvenovány jako tymin.

V první reakci enzymy TET2 a T4-fág beta glukosyltransferasa (T4-βGT) převádí 5mC a 5hmC na produkty, jež nemohou být deaminovány pomocí enzymu apolipoprotein B mRNA upravující katalytickou podjednotku 3A (APOBEC3A). TET2 je Fe(II)/alfa-ketoglutarát-dependentní dioxygenasa, která katalyzuje oxidaci 5mC na 5hmC, poté 5-formylcytosinu (5fC) a nakonec 5caC se současnou tvorbou CO₂ a sukcinátu (Tamanaha *et al.*, 2016). T4-βGT katalyzuje glukosylaci jak TET2-formovaného, tak genomového 5hmC na 5-(p-glukosyloxymetyl)cytosin (5gmC).

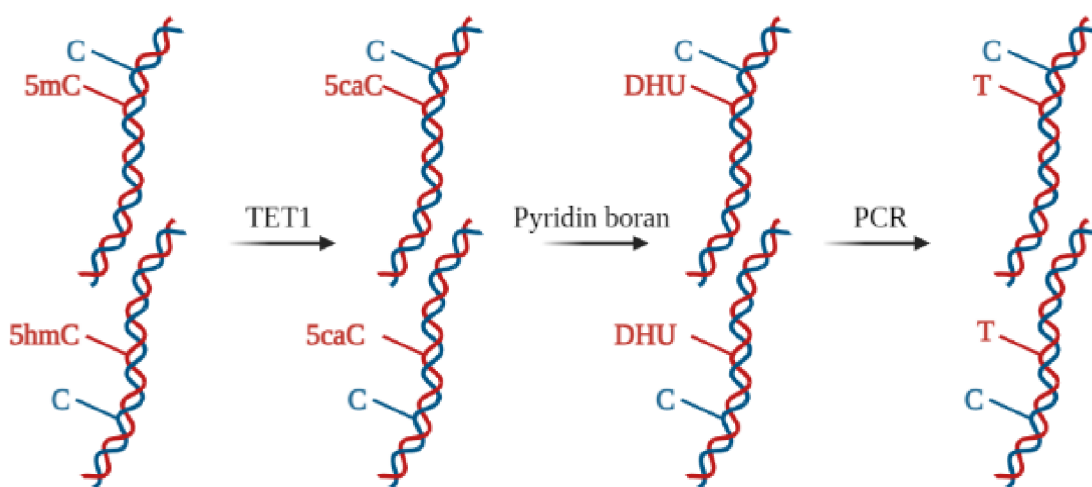
V následujícím kroku APOBEC3A deaminuje nemodifikované cytosiny, čímž je převádí na uracil. Enzym má přitom silnou preferenci k dinukleotidům tymin-cytosin a cytosin-cytosin na jednovláknové DNA (Silva *et al.*, 2018; Wijesinghe & Bhagwat, 2012). Může být využita také upravená forma tohoto enzymu, jež plně deaminuje všechny cytosinové nebo 5mC oligonukleotidové substráty při prodloužení reakční doby.

Využití těchto tří enzymů nám tedy umožňuje efektivně odlišit 5mC a 5hmC od nemetylovaného cytosinu. Enzym TET2 účinně oxidoval ≥ 99 % 5mC v řadě organismů včetně myši, lidí a *Arabidopsis thaliana*, přičemž jeho aktivita je robustní a dochází z 70-80 % ke tvorbě 5caC a přibližně z 10 % ke tvorbě každého meziprojektu 5hmC a 5fC. Porovnáním bisulfitové konverze s enzymatickou se zabývá mimo jiné skupina Vaisvila *et al.* Zjistili, že ačkoliv bylo po enzymatické konverzi detekováno podobné množství 5mC a 5hmC jako po bisulfitové konverzi, knihovny vytvořené pomocí enzymatického metylového sekvenování (EM-seq) předčily knihovny po bisulfitové konverzi v různých specifických oblastech: knihovny EM-seq měly vyšší výtěžky s použitím menšího počtu cyklů PCR pro všechny vstupy DNA a obsahovaly méně PCR duplikátů, což vedlo k více použitelným čtením při bioinformatické analýze, a tedy ke zvýšení efektivního pokrytí genomu. Knihovny EM-seq také vedly k více normalizovanému profilu guanin-cytosin než bisulfitové knihovny, které mají profil bohatý na dinukleotid adenin-tymin a chudý na guanin-cytosin. Celkově bylo pro provedení konverze potřeba také nižší množství vstupní DNA při zachování kvality výsledků (Vaisvila *et al.*, 2021).

V posledních letech bylo také skupinou Liu *et al.* popsáno TET-asistované pyridin boranové sekvenování (TAPS), v němž je kombinován enzymatický krok následovaný chemickou reakcí k detekci 5mC a 5hmC. TAPS detekuje také další dvě kovalentní DNA modifikace, konkrétně 5fC a 5caA, které jsou však v savčím genomu přítomny pouze ve velmi nízkém množství (Ito *et al.*, 2011). Modifikace TAPS metody nazývaná TAPS β umožňuje pomocí β -glukosyltransferasy, jež navázáním glukosy chrání 5hmC proti působení TET enzymu, selektivně detekovat pouze 5mC. Je známa též takzvaná chemicky asistovaná (CAPS) modifikace, při níž je TET enzym nahrazen oxidačním činidlem perruthenátem sodným, jež umožňuje selektivní detekci 5hmC (Liu & Song, 2022). Dalšími modifikacemi této metody je například metoda endonukleasového obohacení (eeTAPS), jež využívá štěpení endonukleasou rozeznávající DHU, což umožňuje přípravu knihovny s fragmenty, jejichž okraje odpovídají metylovanému

místu (Cheng *et al.*, 2021) a metoda TAPS pro cirkulující volnou DNA (cfTAPS), jež může být využita například pro včasnou detekci onkologických chorob (Siejka-Zielińska *et al.*, 2021).

Metoda TAPS spoléhá na schopnost TET1 enzymu oxidovat 5-metylcytosin a 5-hydroxymetylcytosin na 5-karboxycytosin. Působením pyridin boranu je 5-karboxycytosin posléze redukován na dihydrouracil (DHU). Během PCR poté dochází k amplifikaci dihydrouracilu na thymin, čímž je umožněna diferenciace mezi modifikovanými a nemodifikovanými cytosiny (obrázek 5).



Obrázek 5 Schéma průběhu TAPS reakce. Prvním krokem je enzymatická reakce TET1 s modifikovanými cytosiny za vzniku 5-karboxycytosinu. 5-karboxycytosin je poté pyridin boranem přeměněn na dihydrouracil, jenž je v průběhu PCR transformován na thymin. Nemodifikované cytosiny zůstávají nezměněny.

DNA modifikace jsou s využitím TAPS detekovány přímo, s vysokou citlivostí a specificitou, aniž by byly ovlivněny nemodifikované cytosiny. Metoda je též teoreticky méně destruktivní, neboť využívá teploty 37 °C, zachovává fragmenty DNA delší než 10 kilobází a umožňuje vyšší rychlost mapování spolu s rovnoměrnějším pokrytím (Liu *et al.*, 2019).

2.4.3 Další způsoby analýzy metylace

Kromě metod založených na specifických chemických reakcích a na použití specifických enzymatických reakcí existuje také řada dalších metod, jež nám umožňují analyzovat metylaci cytosinu. První takovou skupinou metod jsou metody založené na afinitním obohacení metylované DNA, mezi jejichž výhody patří zejména jejich spolehlivost, specificita a nízká finanční náročnost (Hsu *et al.*, 2020; Pajares *et al.*, 2021). Do této

skupiny můžeme zařadit například metodu imunoprecipitace metylované DNA (MeDIP), metodu zachycení pomocí metyl-CpG vazebné domény (MBD) a další. Tyto přístupy jsou založeny na specifické precipitaci metylovaných cytosinů, což umožňuje vznik obohacené frakce a následnou snadnější analýzu (Aberg *et al.*, 2012; Cheung *et al.*, 2012).

Metoda MeDIP byla prvně popsána skupinou Weber *et al.* (Weber *et al.*, 2005). Pro samotné obohacení přitom využívá monoklonální protilátky, jež jsou cíleny proti metylovaným cytosinům (Ruike *et al.*, 2010; Weng *et al.*, 2009). DNA musí být v tomto případě denaturována a náhodně fragmentována na úseky dlouhé 300-600 bp (Mohn *et al.*, 2009). Takto obohacená DNA může být následně využita pro hybridizaci na čipech (MeDIP-chip) (Hsu *et al.*, 2015), případně pro sekvenování (MeDIP-seq) (Jacinto *et al.*, 2008). Obohacení na principu MBD zachycení bylo v rámci dřívějších studií označeno za robustní a cenově výhodný přístup analýzy metylace DNA (Aberg *et al.*, 2015; Meyer *et al.*, 2013), jenž bývá využíván ve formátu různých komerčních souprav (Aberg *et al.*, 2014; Meyer *et al.*, 2013). Tento přístup využívá k zachycení rekombinantní vazebnou doménu MBD polypeptidu s vysokou afinitou k metylovaným cytosinům (Serre *et al.*, 2010). Dvouvláknové DNA fragmenty jsou nejprve vázány doménou, jež je součástí afinitní kolony a následně jsou eluovány činidlem se zvyšující se koncentrací solí (Nair *et al.*, 2011). Zvyšující se koncentrace soli přitom eluuje vícenásobně metylovanou DNA (Cross *et al.*, 1994).

Další skupinou metod pro analýzu metylace DNA jsou metody využívající specifické restriční enzymy (MRE). Tyto metody jsou oproti metodám založeným na specifických enzymatických reakcích založeny na restričních endonukleasách (například *MspI*, *HpaII*, *SmaI*), jež specificky štěpí DNA po rozpoznání metylovaného cytosinu, přičemž analýza může být následována sekvenováním (MRE-Seq). MRE-Seq konkrétně spočívá ve specifickém štěpení genomové DNA metylačně-senzitivními restričními enzymy, které následuje příprava knihovny a sekvenování, jež umožňuje detekci metylačních míst v genomu (Rauluseviciute *et al.*, 2019). Pro účely vyššího rozlišení a efektivity stanovení celogenomového metylačního profilu je možné metody MRE kombinovat také s metodou MeDIP či jinými metodami založenými na afinitním obohacení (Li *et al.*, 2015).

Metylace cytosinů může být detekována také napřímo pomocí technologie jednomolekulového čtení v reálném čase firmy Pacific Biosciences či nanopórového sekvenování firmy Oxford Nanopore Technologies. Tyto metody překonávají omezení masivně paralelního sekvenování ve formě krátkého čtení, neboť umožňují dlouhá čtení na neamplifikované DNA. Při SMRT dochází za katalýzy DNA polymerasou k začlenění fluorescenčně značených nukleotidů do řetězců nukleové kyseliny, přičemž výsledné fluorescenční impulsy umožňují přímou detekci nukleotidů v templátovém vlákně (Flusberg *et al.*, 2010). Modifikace bází přitom mění kinetiku polymerasy, což umožňuje detekci kovalentních změn v DNA. 5mC má však konkrétně na kinetiku DNA polymerasy menší efekt (Tse *et al.*, 2021), z tohoto důvodu je proto vyžadováno vyšší pokrytí či modifikace 5mC pro zvýšení kinetického efektu této báze (například glykosylace či převedení na 5caC) (Clark *et al.*, 2013). Tato metoda je přístupná dlouhým čtecím délkám a umožňuje mapování metylačních vzorců i ve vysoce repetitivních genomických oblastech. Metoda nanopórového sekvenování spočívá v detekci změn napětí při průchodu nukleotidů nanopórem. Nukleotidové vlákno je přitom elektroforetickými silami vedeno skrz nanopór, který je součástí elektricky nabitě membrány. Na základě konkrétní změny napětí je možné usoudit, která nukleotidová báze nanopórem prošla (Liu *et al.*, 2021). Metody přímo detekce metylace cytosinů jsou limitovány nutností vkladu neamplifikované DNA v řádech mikrogramů, což může znemožnit jejich využití pro nižší vstupní množství DNA (Gouil & Keniry, 2019).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístrojové vybavení

Pre-PCR

- Biohazard Box HERAsafe KS; ThermoFisher Scientific
- VortexMixer; Benchmark Scientific
- Mini centrifuga/vortex Combi-Spin FVL-2400N; BioSan
- Vortex Genie 2; P-lab
- Vortex Lab Dancer; IKA
- Termoblok ThermoStat plus; Eppendorf
- Termoblok ThermoStat C; Eppendorf
- Mini centrifuga GMC Lab; Gilson
- Centrifuga MiniSpin; Eppendorf
- Termocyklér MasterCycler Nexus; Eppendorf
- Sekvenátor MiSeq; Illumina
- TapeStation4200; Agilent Technologies
- Ultrasonikátor ME220; Covaris
- Stripy 8 microTUBE V1 pro fragmentaci DNA; Covaris
- PCR zkumavky, Eppendorf zkumavky 1,7 ml, PCR desky, 0,2 ml stripy, zkumavky určené pro fluorimetrii
- Pipety, multikanálové pipety, špičky; Eppendorf

PCR

- Centrifuga 5430; Eppendorf
- Realtime PCR cyklér CFX96; Biorad

Post-PCR

- Biohazard Box Mars Safety Classe 2; LaboGene
- MiniCentrifuge FC5306; Ohaus
- Qubit 2.0 Fluorimetr; ThermoFisher Scientific
- PCR zkumavky, Eppendorf zkumavky 1,7 ml, PCR destičky,
- 0,2 ml stripy, zkumavky určené pro fluorimetrii
- Pipety, multikanálové pipety, špičky; Eppendorf

Software

- Bio-Rad CFX Maestro 2.2 v5.2.008.0222
- Agilent TapeStation Controller Software 5.1
- Illumina Experiment Manager 1.19.1
- SeqMonk v1.48.1

3.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Vzorky

Vzorky periferní krve použité v následujících experimentech byly vybrány z databáze celkem 200 vzorků zdravých českých dárců krve ve věku 20 až 63 let. Vzorky byly získány s informovaným souhlasem v rámci první fáze projektu ENIGMA (Czech Genome Project), schváleného etickou komisí pod číslem 119/18.

Z databáze bylo vybráno pro následující experimenty celkem pět vzorků, viz tabulka 2. Pro některé experimenty byl také používán referenční laboratorní vzorek (věk původce DNA v době odběru 54 let).

Tabulka 2 Vzorky periferní krve českých dárců

Označení vzorku	Číslo vzorku	Věk dárce
18-998-4083	1	37
18-1425-4830	2	57
18-2152-5599	3	47
18-2229-5748	4	41
19-160-6616	5	23

Soupravy

- Souprava pro kvantifikaci DNA Qubit™ Quantification Assay (ThermoFisher Scientific), #Q32851. V závislosti na požadavcích měření byla použita souprava pro měření dsDNA Broad Range (4 až 2000 ng), dsDNA High Sensitivity (0,1 až 120 ng) nebo ssDNA (0,2 až 240,0 ng)
- Souprava na přípravu metylovaného standardu pomocí CpG metyltransferasy (New England Biolabs), #M0226S
- Souprava pro přípravu nemetylovaného standardu: GenomePlex® Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit (Sigma-Aldrich), #WGA2

- Souprava pro metyl-specifickou PCR geneMAP™ MGMT Methylation Analysis Kit (GenMark), #MGM-RT50
- Souprava pro bisulfitovou konverzi EZ DNA-Methylation-Gold Kit (Zymo Research), #D5005
- Souprava pro enzymatickou konverzi NEBNext: NEBNext® Enzymatic Methylation Conversion Module (New England Biolabs), #E7125S
- Souprava pro přečištění DNA: QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen), #28106
- Souprava pro přípravu knihovny Nextera XT DNA Library Preparation kit (Illumina), #FC-131-1024
- Souprava pro indexaci Nextera XT Index Kit (Illumina), #FC-131-1001

Chemikálie

- DEPC-Treated Water, nuclease-free (ThermoFisher Scientific), #AM9915G
- Absolutní etanol pro UV (Penta), #02850M1000
- Platinum Multiplex PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific), #4464268
- EvaGreen Dye, 20x in water (Biotium), #31000
- Formamid (Sigma-Aldrich), #47671
- Hydroxid sodný (Lach-ner), #10006
- 1,8X AMPure XP Beads (Beckman Coulter), #A63882
- Tris-EDTA pufr (Sigma-Aldrich), #93283
- Metylovaný standard (Zymo Research), #D5015
- Nemetylovaný standard (Zymo Research), #D5014
- Metylovaný standard (Merck), #S8001M
- Nemetylovaný standard (Merck), #S8001U
- Platinum™ Hot Start PCR Master Mix (2X) (ThermoFisher Scientific), #13000012
- D1000 ladder (Agilent Technologies), #5067-5586
- DNA z lososího mlíčí (Thermofisher Scientific), #AM9680
- Interní pozitivní kontrola (IPC) (ThermoFisher Scientific), #3005
- D1000 sample buffer (Agilent Technologies), #5067-5602

Próby pro evaluaci konverze

Próby pro evaluaci konverze metodou BisQuE byly syntetizovány dle Hong & Shin, 2021. Výrobce: Eurogentec.

- 5'-Cy5®-TCC-AGG-CAG-TGC-GTC-TGC-TGT-MGB-Eclipse® 3'
- 5'-ROX™-AAT-GTT-GTA-TGT-TAT-TTG-TGG- MGB-Eclipse® 3'
- 5'-HEX-TGG-GTG-AAT-ATT-TAG-AAT-G- MGB-Eclipse® 3'
- 5'-6-FAM-TGG-GTG-AAT-ACT-TAG-AAT-G- MGB-Eclipse® 3'

Primery pro evaluaci konverze

Primery pro evaluaci konverze metodou BisQuE byly syntetizovány dle Hong & Shin, 2021. Výrobce: Merck.

- 5'-GAA-ATG-GTT-AAG-AGA-AAG-GGA-AA
- 5'-CCC-ATT-ACA-TTT-TTC-ATC-CTC-A
- 5'-GGG-AAA-ATG-AGG-AAG-TGA-TGA
- 5'-ACA-CAA-AAA-ACC-CTT-CAA-AAA-A
- 5'-AAC-TGC-TAG-AAA-ACC-GCG-TC
- 5'-GAG-GCA-GGC-TCT.TGC-TAT-GT

3.3 Metody

3.3.1 Příprava standardů

3.3.1.1 Příprava metylovaného standardu

Pro přípravu metylovaného standardu byla využita souprava firmy New England Biolabs, #M0226S (viz 3.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky).

Prvním krokem přípravy metylované standardu byla příprava roztoku S-adenosylmetioninu o koncentraci 1600 μM . V tomto kroku byl použit zásobní roztok o koncentraci 32 mM, který byl naředěn na potřebnou koncentraci vodou bez nukleas.

Následně byly v následujícím pořadí smíchány reagentie viz tabulka 3.

Tabulka 3 Reakční mix pro přípravu metylovaného standardu

Reagentie	Objem (μl)
Voda bez nukleas	22
Metyltransferasový reakční pufr	5
S-adenosylmetionin (1600 μM)	5
DNA (80 ng/ μl)	12
Metyltransferasa (<i>M.sssI</i>)	6 (24 IU)

Výsledný roztok byl promíchán pipetováním a inkubován při 37 °C po maximální doporučenou dobu 4 h. Reakce byla následně zastavena zahřátím na 65 °C po dobu 20 min. Standard byl uchován při -20 °C do použití.

3.3.1.2 Příprava nemetylovaného standardu

Pro přípravu nemetylovaného standardu byla využita souprava GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit (Sigma-Aldrich), #WGA2 (viz 3.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky).

Fragmentace

Nejprve byly izolovány vzorky DNA a byla kvantifikována jejich koncentrace metodou Qubit DNA BR. Byl připraven roztok o koncentraci 1 ng/μl. Dále byl přidán 1 μl fragmentačního pufru (10x) do 10 μl DNA vzorku v PCR zkumavce. Následně byla PCR zkumavka vložena do cykléru a zahřívána po dobu přesně 4 min při teplotě 95 °C. Vzorek byl poté ihned zchlazen na ledu a centrifugován.

Příprava knihovny

Do každého vzorku byly přidány 2 μl pufru pro přípravu knihovny (1x) a 1 μl stabilizačního roztoku. Vzorek byl promíchán na vířivé třepačce (zvortexován), centrifugován a poté zahříván po dobu přesně 2 minut při 95 °C. Poté byl zchlazen na ledu, centrifugován a znovu vrácen na led. Následně byl přidán 1 μl enzymu pro přípravu knihovny a vzorek byl opět zvortexován a centrifugován. V posledním kroku přípravy knihovny byl vzorek vložen do termocykléru a inkubován viz tabulka 4.

Tabulka 4 Nastavení termocykléru pro přípravu nemetylovaného standardu (příprava knihovny)

Teplota (°C)	Délka cyklu (min)
16	20
24	20
37	20
75	5
4	do ukončení

Amplifikace

Po dokončení přípravy knihovny byly vzorky vyjmuty z termocykléru a centrifugovány. Pro amplifikaci byly k připraveným vzorkům napipetovány reagentie viz tabulka 5.

Tabulka 5 Amplifikační mastermix pipetovaný ke vzorkům po přípravě knihovny

Reagencie	Objem (μl)
10x Amplifikační mastermix	7,5
Voda	47,5
WGA DNA polymerasa	5,0

Vzorky byly následně vortexovány, centrifugovány a vloženy do termocykléru nastaveného na program viz tabulka 6.

Tabulka 6 Nastavení termocykléru pro přípravu nemetylovaného standardu (amplifikace)

Fáze	Teplota (°C)	Délka cyklu
Iniciační denaturace	95	3 min
Následující kroky byly opakovány celkem 14x		
Denaturace	94	15 s
Annealing a extenze	65	5 min

Po dokončení reakce byly standardy uchovány při -20 °C do použití.

3.3.2 Kvantifikace DNA

Pro kvantifikaci DNA byla použita souprava Qubit™ dsDNA Quantification Assay (ThermoFisher Scientific), #Q32851 (viz kapitola 3.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky). V závislosti na požadavcích měření byla použita souprava pro měření dsDNA Broad Range (4 až 2000 ng), dsDNA High Sensitivity (0,1 až 120,0 ng) nebo ssDNA (0,2 až 240,0 ng). Pro kvantifikaci DNA byly do Qubit zkumavek pipetovány reagenty viz tabulka 7.

Tabulka 7 Reagenty pro kvantifikaci DNA

Reagenty	Objem (μl)
Qubit pufr	198
Qubit barva	1
DNA	1

Po smíchání byla směs vortexována a byla měřena koncentrace DNA na Qubit Fluorimetru.

3.3.3 Metyl-specifická PCR

Pro metyl-specifickou PCR byla použita souprava geneMAP™ MGMT Methylation Analysis Kit (GenMark), #MGM-RT50 (viz 3.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky).

Pro provedení PCR byly smíchány reagenty viz tabulka 8. Na reakci bylo potřeba kromě vzorků připravit také pozitivní a negativní kontrolu, jež byly součástí soupravy.

Tabulka 8 Reagenty pro metyl-specifickou PCR

Reagenty	Objem na reakci (μl)
2x Master Mix	10
4x MGMT Primer Probe Mix	5
Konvertovaná DNA/pozitivní nebo negativní kontrola	5

Vzorky i kontroly byly následně vortexovány, centrifugovány a vloženy do real-time cykléru nastaveného na program viz tabulka 9. Amplifikace byla čtena v kanálech FAM a VIC.

Tabulka 9 Nastavení real-time cykléru pro metyl-specifickou PCR

Teplota (°C)	Délka cyklu	Počet cyklů
95	15 min	1
95	20 s	45
60	1 min	

3.3.4 Bisulfitová konverze

Pro bisulfitovou konverzi byla použita souprava EZ DNA-Methylation-Gold Kit (Zymo Research), #D5005 (viz 3.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky). Vstupní množství DNA do reakce bylo 100 ng.

Prvním krokem bisulfitové konverze je příprava CT konverzního reagentu. Do zkumavky CT Conversion Reagent s potřebným práškem, jež byla před použitím stočena, bylo přidáno 900 μl vody bez nukleas, 300 μl M-Dilution pufru a 50 μl M-Dissolving pufru. Hotová konverzní směs byla následně třepána po dobu 10 minut při laboratorní teplotě.

Po přípravě konverzního reagentu bylo smícháno 130 μl připravené konverzní směsi a 20 μl DNA. Směs byla promíchána pipetováním, krátce stočena (10 000 g, 1 min) a následně umístěna do termocykléru, nastaveného na program viz tabulka 10.

Tabulka 10 Nastavení termocykléru pro bisulfitovou konverzi

Teplota (°C)	Délka cyklu
98	10 min
64	150 min
4	až 20 h

V rámci experimentální části byly také vyzkoušeny dva alternativní protokoly viz tabulka 11 a 12. Tyto protokoly mají potenciál pro lepší PCR amplifikaci delších DNA fragmentů.

Tabulka 11 Nastavení termocykléru pro bisulfitovou konverzi – alternativa 1

Teplota (°C)	Délka cyklu	
98	10 min	8 cyklů
53	30 min	
53	6 min	
37	30 min	
4	až 20 h	

Tabulka 12 Nastavení termocykléru pro bisulfitovou konverzi – alternativa 2

Teplota (°C)	Délka cyklu
98	10 min
53	4 h
4	až 20 h

Následně byl připraven M-Wash pufr smícháním 1,2 ml M-Wash koncentrátu a 4,8 ml 100% ethanolu a promíchán zvortexováním.

Na Zymo-spin kolonku umístěnou ve sběrné zkumavce bylo nanášeno 600 µl M-Binding pufru a plný objem vzorku (150 µl). Směs byla promíchána několika převráceními zkumavky. Poté byla směs centrifugována (10 000 g, 1 min) a po centrifugaci byla vyprázdněna sběrná zkumavka. Následně bylo na kolonku nanášeno 100 µl M-Wash pufru a kolonky byly centrifugovány (10 000 g, 1 min). Poté bylo nanášeno 200 µl M-Desulphonation pufru, směs byla inkubována po dobu 20 min při laboratorní teplotě a opět centrifugována (10 000 g, 1 min). Následně bylo na kolonku nanášeno 200 µl M-Wash pufru, kolonky byly znovu centrifugovány (10 000 g, 1 min) a

po centrifugaci byly vyprázdněny sběrné zkumavky. Tento krok byl ještě jednou zopakován bez vyprázdnění sběrných zkumavek; namísto toho byly poté kolonky přeneseny na čisté zkumavky. Poté bylo přidáno 10 µl Elution pufru a směs byla centrifugována po dobu 1 min.

Po bisulfitové konverzi bylo kvantifikováno množství DNA měřením na Qubit Fluorimetru (viz 3.3.2 Kvantifikace DNA) a DNA byla zamražena při -20 °C do dalšího použití.

3.3.5 Enzymatická konverze

3.3.5.1 NEBNext

Pro enzymatickou konverzi NEBNext byla použita souprava NEBNext® Enzymatic Methyl-seq Conversion Module (New England Biolabs), #E7125S (viz 3.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky).

Příprava DNA

Jako počáteční materiál bylo využito 100 ng fragmentované DNA, jež byla rozpuštěna celkem v 55 µl vody bez nukleas. DNA byla fragmentována na ultrasonikátoru Covaris ME220 nastaveného na program pro 8 microTUBE Strip V1 150 bp viz tabulka 13.

Tabulka 13 Nastavení programu pro fragmentaci DNA

Base Pair Mode (cílová délka fragmentů, bp)	150
Duration (doba působení, s)	225
Peak Power (špičkový výkon, W)	75
Duty Factor (činitel využití, %)	25
Cycles per Burst (počet cyklů na zážeh, #)	1000

Oxidace 5-metylcytosinů a 5-hydroxymetylcytosinů

Prvním krokem byla příprava TET2 pufru, která proběhla smícháním 100 µl TET2 reakčního pufru s TET2 suplementem ve zkumavce. Tato směs byla zvortexována a používána po dobu maximálně 4 měsíců dle doporučení výrobce.

Následně byly ke 28 µl fragmentované DNA na ledu přidány reagenty dle tabulky 14. Veškeré reagenty pro oxidaci 5-metylcytosinů a 5-hydroxymetylcytosinů byly součástí komerční soupravy.

Tabulka 14 Reagencie pro oxidaci 5-metylcytosinů a 5-hydroxymetylcytosinů

Reagencie	Objem (μl)
TET2 pufr (viz krok Příprava DNA)	10
Oxidační suplement	1
Dithiotreitol	1
Oxidační enhancer	1
TET 2	4

Výsledná směs byla zvortexována a stočena. Následně bylo ke 45 μl DNA přidáno 5 μl roztoku Fe^{II} připraveného rozpuštěním 1 μl 500 mM roztoku Fe^{II} v 1 249 μl vody. Výsledná směs byla promíchána pipetováním, stočena a umístěna do termocykléru pro inkubaci v délce 1 h při 37 °C.

Po inkubaci byly vzorky přemístěny na led a byl přidán 1 μl Stop Reagentu ke každému vzorku. Výsledná směs byla vortexována a stočena a inkubována poté v délce 30 min při 37 °C.

Pročištění TET2 konvertované DNA

DNA po oxidaci byla přečištěna s využitím směsi AMPure XP Beads, jež byla před použitím ponechána minimálně 30 minut na pokojové teplotě a resuspendována vortexováním.

Prvním krokem pročištění bylo přidání 90 μl resuspendované směsi AMPure XP Beads ke každému vzorku. Směs byla poté promíchána pipetováním a inkubována při pokojové teplotě po dobu 5 min. Poté byly zkumavky umístěny na magnetický stojánek pro separaci kuliček od supernatantu. Po oddělení kuliček od supernatantu byl supernatant odpipetován. Poté byla směs na magnetickém stojánku pročištěna přidáním 200 μl čerstvě připraveného 80% ethanolu, který byl ve směsi ponechán po dobu 30 s a poté odpipetován. Tento krok byl opakován celkem 2x. Poté byly kuličky s DNA ponechány na pokojové teplotě po dobu maximálně dvou minut k vysušení a následně byly promyty 17 μl elučního pufru mimo magnetický stojánek. Výsledná směs byla promíchána pipetováním, inkubována po dobu 1 min při pokojové teplotě a umístěna na magnetický stojánek. Po oddělení kuliček od supernatantu bylo 16 μl supernatantu odpipetováno do nové zkumavky.

Denaturace DNA

DNA byla denaturována dvěma způsoby:

1. Použitím čerstvě připraveného 0,1 M hydroxidu sodného. Ke každému vzorku po pročištění byly přidány 4 μ l hydroxidu sodného. Směs byla zvortexována, stočena a umístěna do termocykléru zahřátého na 50 °C po dobu 10 min. Poté byly zkumavky okamžitě umístěny na led.
2. Přidáním 4 μ l formamidu k 16 μ l oxidované DNA. Směs byla zvortexována, stočena a vložena do termocykléru zahřátého na 85 °C po dobu 10 min. Zkumavky byly poté okamžitě umístěny na led.

Deaminace cytosinů

Na ledu byly ke 20 μ l DNA přidány reagentie dle tabulky 15. Veškeré reagentie pro deaminaci cytosinů byly součástí komerční soupravy.

Tabulka 15 Reagentie pro deaminaci cytosinů

Reagentie	Objem (μ l)
Voda bez nukleas	68
APOBEC reakční pufr	10
Bovinní sérový albumin	1
APOBEC	1

Výsledná směs byla zvortexována, stočena a inkubována po dobu 3 h při teplotě 37 °C v termocykléru.

Pročištění deaminované DNA

DNA po deaminaci byla pročištěna s využitím směsi AMPure XP Beads, jež byla před použitím ponechána minimálně 30 minut na pokojové teplotě a resuspendována vortexováním.

Prvním krokem pročištění bylo přidání 100 μ l resuspendované směsi AMPure XP Beads ke každému vzorku. Směs byla poté promíchána pipetováním a inkubována při pokojové teplotě po dobu 5 min. Poté byly zkumavky umístěny na magnetický stojánek pro separaci kuliček od supernatantu. Po oddělení kuliček od supernatantu byl supernatant odpipetován. Poté byla směs na magnetickém stojánku pročištěna přidáním

200 μl čerstvě připraveného 80% ethanolu, který byl ve směsi ponechán po dobu 30 s a poté odpipetován. Tento krok byl opakován celkem 2x. Poté byly kuličky s DNA ponechány na pokojové teplotě po dobu maximálně dvou minut k vysušení a následně byly promyty 21 μl elučního pufru mimo magnetický stojánek. Výsledná směs byla promíchána pipetováním, inkubována po dobu 1 min při pokojové teplotě a umístěna na magnetický stojánek. Po oddělení kuliček od supernatantu bylo 20 μl supernatantu odpipetováno do nové zkušavky.

3.3.6 Kvantitativní polymerasová řetězová reakce (qPCR)

Pro provedení qPCR byly nejprve připraveny primer mixy dle tabulky 16.

Tabulka 16 Příprava primerových mixů

Mix A		Mix B		Mix C	
CCDC102B_F	1,0 μl	PDE4C_F	1,5 μl	MIR29B2CHG_F	0,5 μl
CCDC102B_R	1,0 μl	PDE4C_R	1,5 μl	MIR29B2CHG_R	0,5 μl
ELOVL2_F	1,0 μl	FHL2_F	0,5 μl	Voda	24,0 μl
ELOVL2_R	1,0 μl	FHL2_R	0,5 μl		
Voda	21,0 μl	Voda	21,0 μl		

Následně byly do stripu nebo destičky pipetovány reagentie viz tabulka 17.

Tabulka 17 Reagentie pro qPCR reakci

Reagentie	Objem na jeden vzorek (μl)
Platinum Multiplex PCR Master Mix, 2 \times	6,25
Voda bez nukleas	2,20
Eva Green 20x	0,30
Primer mix A/B/C	1,25
DNA	3,00
Celkový objem reakčního mixu	12,00

Destička či strip byly poté krátce stočeny a umístěny do termocykléru nastaveného na program viz tabulka 18.

Tabulka 18 Nastavení termocykléru pro qPCR

Teplota (°C)	Délka cyklu	Opakování
98	2 min	4x
94	30 s	
65*	90 s	
72	60 s	
Snímání fluorescence		
94	30 s	30x
56	90 s	
72	60 s	
Snímání fluorescence		
72	10 min	

* = pokles teploty o 3 °C každý cyklus

Po qPCR byly vzorky uskladněny při -20 °C do dalšího použití.

3.3.7 Digitální elektroforéza

Pro provedení digitální elektroforézy byl nejprve D1000 vzorkový pufr ponechán při pokojové teplotě po dobu nejméně 30 minut. Mezitím byl zapnut Agilent TapeStation Controller software, kde bylo nastaveno odpovídající množství vzorků a elektronický žebřík.

Vzorkový pufr byl zvortexován a krátce stočen. Následně byly do stripu nebo destičky nanесeny 3 µl pufru a 1 µl DNA. Takto připravené vzorky byly zvortexovány, krátce stočeny a umístěny do přístroje. Do přístroje bylo také nachystáno dostatečné množství pipet a také D1000 ScreenTape. Tlačítkem „Start“ byla spuštěna elektroforéza. Vyhodnocení bylo vždy provedeno ihned po analýze.

3.3.8 Přечиštění vzorků

Po provedení digitální elektroforézy byly jednotlivé amplikony A, B a C každého vzorku smíchány tak, aby RFU méně koncentrovaného amplikonu byly shodné. Vzorky vytvořené smícháním tří amplikonů byly následně přечиštěny pomocí soupravy pro přечиštění DNA: QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen), #28106 (viz 3.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky)

Nejprve byl vzorek smíchán s pětinasobným množstvím PB pufru a promíchán pipetováním. Následně byl vzorek přenesen na kolonku umístěnou ve sběrné zkumavce a centrifugován (10 000 g, 1 min). Poté bylo na kolonku naneseo 750 µl PE pufru a vzorek byl opět centrifugován (10 000 g, 1 min). Po centrifugaci byla vyprázdněna sběrná zkumavka a vzorek byl znovu centrifugován pro odstranění zbytku PE pufru. V posledním kroku přečištění byla kolonka přemístěna na čistou 1,5 ml zkumavku, na kolonku bylo naneseo 20 µl vody bez nukleas a po jedné minutě byly vzorky opět centrifugovány (10 000 g, 1 min). Následně byla změřena koncentrace DNA ve vzorku pomocí Qubit dsDNA HS Assay soupravy (viz 3.3.2 Kvantifikace DNA).

3.3.9 Příprava knihovny

Pro přípravu knihovny byla použita souprava Nextera XT DNA Library Preparation kit (Illumina) #FC-131-1024 a indexy byly použity ze soupravy Nextera XT Index Kit (Illumina) #FC-131-1001 (viz 3.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky).

Vzorky byly nejprve naředěny na koncentraci 0,5 ng/µl. V 0,2 ml PCR zkumavce bylo poté smícháno 2,5 µl Tagment DNA pufru, 1,25 µl ATM mixu a 1,25 µl naředěného vzorku. Směs byla promíchána pipetováním a krátce stočena. Následně byly vzorky umístěny do termocykléru a byl spuštěn program viz tabulka 19.

Tabulka 19 Program pro tagmentaci

Teplota (°C)	Délka cyklu (min)
55	5
10	-

Po tagmentaci bylo přidáno 1,25 µl NT pufru. Směs byla promíchána pipetováním, stočena a následně inkubována při laboratorní teplotě po dobu 5 min.

V následujícím kroku bylo přidáno 3,75 µl NPM mixu, 1,25 µl index primeru i5 a 1,25 µl index primeru i7. Vzorky byly promíchány pipetováním, stočeny a umístěny do termocykléru nastaveného na program Tag PCR 16a viz tabulka 20.

Tabulka 20 Program pro indexační PCR

Teplota (°C)	Délka cyklu	Opakování cyklu
72	3 min	
95	30 s	
95	10 s	16x
55	30 s	
72	30 s	
72	5 min	
10	-	

Po dokončení PCR byly amplifikované knihovny přečištěny pomocí QIAquick Purification kitu (viz 3.3.8 Přečištění vzorků) a kvantifikovány pomocí Qubit dsDNA HS Assay soupravy (viz 3.3.2 Kvantifikace DNA).

3.3.10 Sekvenování a vyhodnocení sekvenačních výsledků

Všechny indexované knihovny určené k sekvenování byly ekvimolárně smíchaný a vzniklý pool byl znovu kvantifikován pomocí Qubit dsDNA HS Assay soupravy (viz 3.3.2 Kvantifikace DNA). Takto připravený pool byl předán příslušným zaměstnancům ÚMTM na sekvenování.

Mezitím byl připraven rozpis (sample sheet) pomocí programu Illumina Experiment Manager. V tomto programu byla zvolena varianta pro MiSeq, v kategorii „Other“ a byla zvolena varianta „FASTQ only“. V rozhraní „Workflow parameters“ byly vyplněny potřebné parametry viz tabulka 21.

Tabulka 21 Nastavení workflow parametrů v programu Illumina Experiment Manager

Library Prep Workflow	Nextera XT
Index Adapters	Nextera XT Index Kit
Index Reads	2 (Dual)
Read Type	Paired End
Cycles Read 1	151
Cycles Read 2	151

V rozhraní „Sample detection“ byl přidán odpovídající počet vzorků. Dále bylo vyplněno unikátní označení vzorků a odpovídající čísla i5 a i7 indexů, přičemž byly

následně automaticky doplněny i sekvence indexů. Poté byl načten soubor s koordinátami analyzovaných amplikonů ve formátu .bed viz tabulka 22 a hotový sample sheet byl uložen.

Tabulka 22 Hodnoty pro vytvoření BED souboru (koordináty jsou uvedeny pro genom hg19)

Chromozom	Start	Stop	Označení
Chr18	66389390	66389503	<i>CCDC102B</i>
Chr6	11044840	11044966	<i>ELOVL2</i>
Chr1	207996950	207997095	<i>MIR29B2CHG</i>
Chr19	18343815	18343970	<i>PDE4C</i>
Chr2	106015677	106015868	<i>FHL2</i>

V rámci bioinformatické analýzy po sekvenování bylo vyhodnocení prvotních sekvenačních dat provedeno Ing. Rastislavem Slavkovským, Ph. D. Tato data byla následně použita pro vyhodnocení v programu SeqMonk, kde byl vytvořen nový projekt a zvolen referenční genom (hg19). Následně byla importována získaná data. Při importu bylo nutné vyplnit popis sloupců v importovaného souboru, viz tabulka 23.

Tabulka 23 Nastavení parametrů pro import vzorků

Column Delimiter	Tab
Start at Row	1
Chr Col	3
Start Col	4
End Col	4
Strand Col	2
Ostatní parametry nezměněny	

Pro anotaci zájmových oblastí byl do programu SeqMonk nainportován příkaz ve formátu .txt nebo .bed. Pro import bylo třeba zvolit parametry viz tabulka 24, zájmové oblasti byly poté ve výstupech programu označeny jako „features“.

Tabulka 24 Nastavení parametrů pro import anotace

Column Delimiter	Tab
Start at Row	0
Chr Col	1
Start Col	2
End Col	3
Name Col	4
Description Col	4
Ostatní parametry nezměněny	

Dalším krokem byla kvantifikace podílu metylovaných cytosinů v jednotlivých vzorcích. V rámci tohoto kroku byla v rozhraní „Data“ zvolena možnost „*Quantitation pipelines*“ a následně byla vybrána varianta „*Bisulphite methylation over features*“. V menu „*Feature to quantify*“ byla poté zvolena varianta „*Existing probes*“. Poté byl vytvořen kvantifikační report, kdy byla v rozhraní „Report“ zvolena možnost „*Annotated probe report*“ a byly nastaveny uvedené parametry viz tabulka 25.

Tabulka 25 Nastavení parametrů pro kvantifikační report

Annotate with	Overlapping (+ příložený BED soubor)
Include	Unannotated probes
Include	Data for currently visible stores
Select List Annotation	0 annotation selected

Pro stanovení věku jsem poté přešla do webového rozhraní <https://shiny.imtm.cz/apps/vrr/meth-age/>, kde je po dosazení metylačních hodnot pro jednotlivé lokusy vykalkulován výsledek stanovení věku.

3.3.11 Evaluace konverze DNA

Pro vyhodnocení úspěšnosti konverze a ztrát či degradace DNA během konverze byla použita metoda kvantitativní evaluace bisulfitově konvertované DNA, zkráceně BisQuE, která byla publikována Sae Rom Hong a Kyoung-Jin Shin v roce 2021 (Hong & Shin, 2021). Veškeré reakční kroky byly převzaty z citovaného článku. Dle článku byly také navrženy próby a primery, jež jsou konkrétně uvedeny v kapitole 3.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky. Pro účely optimalizace byla v rámci několika experimentů otestována varianta PCR touchdown se snížením teploty ze 70 °C na 60 °C a ze 75 °C na 65 °C,

z důvodu neuspokojivých výsledků byl však poté opět používán původní protokol, viz tabulka 26. Později byla také ke standardům a indikátorům přidávána DNA z lososího mlíčí (0,8 μ l/vzorek) pro zvýšení specificity reakce. Indikátory i standardy byly také připravovány 24 hod předem.

Tabulka 26 Nastavení parametrů pro kvantitativní PCR (BisQuE)

Teplota (°C)	Délka cyklu	Opakování cyklu
94	2 min	
94	15 s	40x
60	45 s	

4 VÝSLEDKY

4.1 Výsledky přípravy standardů

Standardy byly úspěšně připraveny a metylační hodnoty byly ověřeny metodou metyl-specifické PCR, již předcházela konverze pomocí bisulfitu sodného. Porovnání metylačních hodnot bylo provedeno s využitím komerčních standardů od firem Zymo Research a Merck. Výsledky byly shrnuty v tabulce 27.

Tabulka 27 Porovnání metylovaných a nemetylovaných standardů, bisulfitová konverze

Vzorek	Očekávaná úroveň metylace (%)	Změřená úroveň metylace (%)
Metylovaný standard (Zymo Research)	100,00	58,30
Nemetylovaný standard (Zymo Research)	0,00	0,03
Metylovaný standard (Merck)	100,00	78,20
Nemetylovaný standard (Merck)	0,00	0,00
Metylovaný standard – mnou připravený	100,00	16,40
Nemetylovaný standard – mnou připravený	0,00	0,00

Na základě výsledků je možné pozorovat, že mnou připravený nemetylovaný standard i komerční nemetylované standardy dosahovaly uspokojivých nízkých hodnot metylace. Naopak metylované standardy dosahovaly všechny nízkých hodnot metylace, mnou připravený standard dokonce dosahoval nejnižších hodnot (16,4 % metylace).

Podobný experiment byl proveden také se třemi vzorky pro otestování funkčnosti metody NEBNext a porovnání získaných hodnot standardů s hodnotami po bisulfitové konverzi. Byly získány výsledky viz tabulka 28.

Tabulka 28 Porovnání metylovaných a nemetylovaných standardů, NEBNext

Vzorek	Úroveň metylace (%)	Rozdíl oproti bisulfitové konverzi
Metylovaný standard (Merck)	56,00	Pokles o 20 %
Nemetylovaný standard (Merck)	0,00	Bez rozdílu
Nemetylovaný standard – mnou připravený	1,14	Nárůst o 1,14 %

Na základě těchto výsledků bylo možné usoudit, že kromě metylovaného standardu (Merck) nedošlo mezi vzorky k výrazným odchylkám výsledků v souvislosti se změnou konverzní metody.

Z důvodu nízkých metylačních hodnot mnou připraveného metylovaného standardu byla navýšena inkubační doba z původní 1 h na maximálně doporučené 4 h. Tímto byl získán standard o hodnotě 63,6 % metylace. Jelikož tato hodnota stále nebyla dostatečná, byl proveden experiment s navýšením množství enzymu z původních 4 IU na 12 IU a 24 IU, což bylo maximální doporučené množství. Jelikož dostatečné hodnoty metylace bylo dosaženo po navýšení množství enzymu na 24 IU, pro následující experimenty byl již metylovaný standard připravován vždy s tímto objemem enzymu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 29.

Tabulka 29 Výsledky navýšení množství enzymu na 12 a 24 IU

Vzorek	Úroveň metylace (%)
Metylovaný standard (12 IU)	77,70
Metylovaný standard (24 IU)	95,58

4.2 Výsledky bisulfitové konverze

Po přípravě standardů byla provedena bisulfitová konverze. Metoda byla nejprve provedena na sadě standardů pro jejich srovnání (viz tabulka 27), následně jsem se zaměřila na sadu pěti patientských vzorků a mnou připravených standardů, aby bylo možné kromě úrovně metylace u standardů také vyhodnotit úspěšnost stanovení věku z krve. Vzorky byly nejprve úspěšně zpracovány bisulfitovou konverzí a následně pokračovala série metod pro stanovení věku (PCR, digitální elektroforéza, přečištění, příprava knihovny a sekvenování). Ztráty DNA po bisulfitové konverzi se pohybovaly v průměru okolo 90 %. Výsledky sekvenování je možné pozorovat v tabulce 30 a 31. Všechny vzorky i standardy se podařilo osekvenovat s dostatečným pokrytím všech lokusů vyjma lokusu *PDE4C*. Po vyhodnocení metylace cytosinu pro jednotlivé vzorky se podařilo stanovit věk s přesností 4,4 let, přičemž nejpřesněji se podařilo odhadnout věk u osob v rozmezí 40-50 let věku, naopak nejnižší přesnost byla u osoby ve věku 23 let. Methylace cytosinu u metylovaného standardu dosahovala uspokojivých hodnot, avšak u nemetylovaného standardu se objevily vysoké hodnoty (až 24,10 %).

Tabulka 30 Výsledky sekvenování po bisulfitové konverzi – pokrytí lokusů; NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard

Lokus	Pokrytí lokusů						
	1	2	3	4	5	NS	MS
<i>MIR29B2CHG</i>	10038	16762	10238	9228	12130	11612	11606
<i>FHL21</i>	11144	10200	14556	3896	11842	3002	8612
<i>FHL22</i>	11400	10354	14928	3980	12212	3278	8946
<i>ELOVL1</i>	8326	3684	2582	1648	2274	180	5260
<i>ELOVL2</i>	8972	3872	2714	1700	2416	182	5016
<i>CCDC102B</i>	2734	416	600	640	616	7681	1060
<i>PDE4C</i>	40	164	830	30	658	0	404

Tabulka 31 Výsledky sekvenování po bisulfitové konverzi – metylace cytosinu a stanovení věku; NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard

Lokus	Úroveň metylace (%)						
	1	2	3	4	5	NS	MS
<i>MIR29B2CHG</i>	91,32	84,76	84,31	89,25	93,50	0,50	98,22
<i>FHL21</i>	57,09	62,90	58,17	50,39	49,10	17,33	96,74
<i>FHL22</i>	52,34	59,31	55,21	49,45	45,95	24,10	96,87
<i>ELOVL1</i>	34,42	44,93	42,33	38,75	29,06	2,22	97,03
<i>ELOVL2</i>	40,69	50,67	47,53	45,10	39,55	7,69	97,92
<i>CCDC102B</i>	56,09	43,27	35,45	40,31	62,75	2,29	97,52
<i>PDE4C</i>	35,00	30,49	25,78	20,00	24,09	-	94,55
Předikovaný věk (roky)	43	53	50	41	32		
Skutečný věk (roky)	37	57	47	41	23		
Odchylka (roky)	6	4	3	0	9		

Experiment byl následně zopakován na stejné sadě vzorků pro ověření výsledků (tabulka 32 a 33). Ztráty po samotné konverzi se v tomto případě pohybovaly opět okolo 91 % a při sekvenování byl opět málo osekvenován lokus *PDE4C*. Jelikož byl tento lokus velmi málo osekvenován u vzorku č. 2, nebylo možné u tohoto vzorku stanovit věk

s využitím stanoveného vzorce. Po vyhodnocení metylace cytosinu pro ostatní vzorky se podařilo stanovit věk s přesností 2,5 let, přičemž nejpřesněji se znovu podařilo odhadnout věk u osob v rozmezí 40-50 let věku, naopak nejnižší přesnost byla opět u osoby ve věku 23 let. Věková odchylka však byla u této osoby o 4 roky nižší než u předchozího experimentu. Methylace cytosinu u metylovaného standardu byla však v tomto případě nižší než u předchozí experimentu a u nemetylovaného standardu bylo dosaženo opět příliš vysokých hodnot až 18,54 %.

Tabulka 32 Výsledky sekvenování po bisulfitové konverzi – pokrytí lokusů; NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard

Lokus	Pokrytí lokusů						
	1	2	3	4	5	NS	MS
<i>MIR29B2CHG</i>	6966	11108	18512	6496	9682	17468	12428
<i>FHL21</i>	10308	628	4508	9778	11644	1122	10010
<i>FHL22</i>	10636	638	4606	10052	12044	1160	10176
<i>ELOVL1</i>	4582	10728	9208	2094	3938	1982	3994
<i>ELOVL2</i>	5296	12490	10438	2426	4202	1994	4454
<i>CCDC102B</i>	910	1418	1730	390	1532	7149	426
<i>PDE4C</i>	3894	10	218	2816	2910	16	4106

Tabulka 33 Výsledky sekvenování po bisulfitové konverzi – metylace cytosinu a stanovení věku; NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard

Lokus	Úroveň metylace (%)						
	1	2	3	4	5	NS	MS
<i>MIR29B2CHG</i>	87,77	78,80	81,55	86,36	93,11	5,78	83,26
<i>FHL21</i>	53,92	55,41	54,69	53,06	37,84	18,54	56,84
<i>FHL22</i>	51,10	51,90	52,89	48,02	37,49	17,41	64,42
<i>ELOVL1</i>	36,71	43,48	42,19	38,68	31,55	0,40	52,78
<i>ELOVL2</i>	42,72	51,95	47,10	48,39	38,66	5,42	78,62
<i>CCDC102B</i>	61,45	41,95	43,63	55,90	60,70	3,47	76,53
<i>PDE4C</i>	26,05	-	20,18	27,08	21,80	-	77,89
Predikovaný věk (roky)	39	-	45	42	28		
Skutečný věk (roky)	37	57	47	41	23		
Odchylka (roky)	2	-	2	1	5		

Při konzultaci s vedoucím práce jsme se rozhodli s využitím ChatGPT zjistit důvody možných falešně pozitivních výsledků u nemetylovaných standardů. Kromě kontaminace, chyby při PCR a nedostatečného pokrytí při sekvenování byly jako další důvod označeny konverzní artefakty, které mohou vznikat při nedostatečné konverzi či nedostatečné denaturaci DNA. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli vyzkoušet novou metodu BisQuE, pomocí níž by bylo možné zjistit, zda byly vzorky dostatečně konvertovány.

4.3 Výsledky NEBNext

Po provedení bisulfitové konverze jsem přešla k otestování alternativní konverzní metody NEBNext. Metoda byla nejprve vyzkoušena na malém množství vzorků viz tabulka 28. Následně byla metoda provedena na sadě pěti patientských vzorků a mnou připravených standardů, aby bylo možné ověřit její úspěšnost v rámci stanovení věku z krve. Vzorky byly nejprve úspěšně zpracovány konverzí a následně pokračovala série metod pro stanovení věku (PCR, digitální elektroforéza, přečištění, příprava knihovny a sekvenování). Ztráty DNA po konverzi se pohybovaly v průměru okolo 97 %.

Po sekvenační analýze bylo možné vyhodnotit pokrytí a metylaci cytosinu viz tabulka 34 a 35. Vzorek č. 2 se nepodařilo řádně osekvenovat, z tohoto důvodu do konečné analýzy nebyl zahrnut. Nejméně osekvenován byl lokus *PDE4C*, zbylé lokusy se podařilo osekvenovat v pořádku. Po stanovení věku u jednotlivých vzorků bylo možné pozorovat velké rozdíly mezi jednotlivými vzorky, přičemž například u vzorku č. 4 bylo dosaženo odchylky 2 let, u vzorku č. 5 až 10 let. Průměrná věková odchylka v tomto případě dosáhla 7 let. Při vyhodnocení standardů bylo možné pozorovat, že ačkoliv metylovaný standard dosahoval kromě lokusu *PDE4C* poměrně vysokých hodnot, u nemetylovaného standardu byla detekována metylace až 65,5 %.

Tabulka 34 Výsledky sekvenování po NEBNext – pokrytí lokusů; NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard

Lokus	Pokrytí lokusů						
	1	2	3	4	5	NS	MS
<i>MIR29B2CHG</i>	2736	58	4704	2638	2564	3080	7986
<i>FHL21</i>	4982	176	6640	5954	10496	4632	20762
<i>FHL22</i>	5100	176	6782	6106	10674	4730	21246
<i>ELOVL1</i>	2642	8	2896	1856	598	1296	10016
<i>ELOVL2</i>	2970	8	2808	1856	588	1268	9798
<i>CCDC102B</i>	2108	4	910	1086	292	816	1330
<i>PDE4C</i>	630	2	272	62	194	86	188

Tabulka 35 Výsledky sekvenování po NEBNext – metylace cytosinu a stanovení věku; NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard

Lokus	Úroveň metylace (%)					
	1	3	4	5	NS	MS
<i>MIR29B2CHG</i>	67,8	93,5	85,1	94,8	65,5	92,4
<i>FHL21</i>	31,9	40,4	32,0	42,9	46,5	84,8
<i>FHL22</i>	52,9	35,6	24,8	39,7	46,0	90,3
<i>ELOVL1</i>	51,0	52,5	49,9	31,8	38,3	98,3
<i>ELOVL2</i>	56,2	69,8	52,9	40,1	66,0	99,2
<i>CCDC102B</i>	43,4	42,0	65,0	56,8	17,6	97,7
<i>PDE4C</i>	9,2	7,4	32,3	27,8	0,0	61,7
Předikovaný věk (roky)	44	38	39	33		
Skutečný věk (roky)	37	47	41	23		
Odchylka (roky)	7	9	2	10		

Metoda NEBNext byla dále zopakována na stejné sadě vzorků a standardů pro ověření výsledků (tabulka 36 a 37). Ztráty po samotné konverzi se v tomto případě pohybovaly opět okolo 97 % a při sekvenování byl opět málo osekvenován lokus *PDE4C*. Po vyhodnocení metylace cytosinu u vzorků se podařilo stanovit věk s přesností 5 let, přičemž nejpřesněji se podařilo stanovit věk u osob v rozmezí 37-41 let, naopak nejnižší

přesnost bylo možné pozorovat u osob ve věku 23 a 47 let. Průměrná odchylka byla však v tomto případě o dva roky nižší než u předchozího experimentu. Metylace cytosinu u metylovaného standardu byla v tomto případě nižší než u předchozího experimentu a u nemetylovaného standardu bylo opět dosaženo příliš vysokých hodnot.

Tabulka 36 Výsledky sekvenování po NEBNext – pokrytí lokusů; NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard

Lokus	Pokrytí lokusů						
	1	2	3	4	5	NS	MS
<i>MIR29B2CHG</i>	4220	5324	3652	5056	1448	4782	1984
<i>FHL21</i>	15052	16172	24128	19612	14080	1092	28602
<i>FHL22</i>	15396	16436	24740	20070	14350	1104	28972
<i>ELOVL1</i>	2310	6094	2352	2088	2224	84	3566
<i>ELOVL2</i>	2250	6100	2092	2084	2316	80	3618
<i>CCDC102B</i>	3418	5672	870	3074	2526	21458	730
<i>PDE4C</i>	698	1204	310	552	570	2	2498

Tabulka 37 Výsledky sekvenování po NEBNext – metylace cytosinu a stanovení věku; NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard

Lokus	Úroveň metylace (%)						
	1	2	3	4	5	NS	MS
<i>MIR29B2CHG</i>	88,24	71,89	87,50	73,02	90,04	2,72	83,60
<i>FHL21</i>	66,83	66,01	55,37	32,77	43,50	99,08	56,29
<i>FHL22</i>	63,06	59,46	46,38	44,23	42,83	99,09	63,36
<i>ELOVL1</i>	42,22	49,82	57,62	34,87	29,33	2,38	62,51
<i>ELOVL2</i>	36,90	58,58	62,80	40,19	33,10	2,50	81,19
<i>CCDC102B</i>	51,79	33,97	36,78	47,80	65,41	1,27	76,10
<i>PDE4C</i>	0,57	27,74	39,35	29,71	25,61	-	77,71
Predikovaný věk (roky)	36	61	59	42	30		
Skutečný věk (roky)	37	57	47	41	23		
Odchylka (roky)	1	4	12	1	7		

Jelikož byly při provedení obou experimentů zaznamenány vysoké ztráty DNA, které převyšovaly ztráty po bisulfitové konverzi, rozhodli jsme se provést alternativní denaturaci pomocí formamidu na sadě standardů a referenčních vzorků a výsledky porovnat. Ztráty po konverzi byly v tomto případě sníženy na 95 %, stále byly však vyšší než po bisulfitové konverzi. Pět vzorků s dostatečnou koncentrací amplikonů bylo poté vybráno k sekvenování. Při analýze sekvančních výsledků (tabulka 38 a 39) bylo možné sledovat, že pokrytí lokusu *PDE4C* bylo u vzorků denaturovaných formamidem lepší než u vzorků denaturovaných NaOH. V rámci metylace cytosinu bylo možné pozorovat různé výsledky. Zatímco u nemetylovaných standardů bylo dosaženo lepší výsledků u denaturace formamidem (průměrně 0,80 % metylace) oproti denaturaci NaOH (průměrně 9,91 % metylace), u metylovaných standardů bylo dosaženo lepších výsledků u denaturace NaOH (průměrně 75,29 % metylace) oproti denaturaci formamidem (průměrně 69,78 % metylace). V obou případech byly však hodnoty u metylovaných standardů nízké. U referenčního vzorku po denaturaci formamidem byl stanoven věk s vysokou odchylkou (22 let). Experiment se však nepodařilo z časových důvodů zopakovat, nelze tedy s určitostí říci, zda byla tato odchylka způsobena změnou denaturační metody.

Tabulka 38 Výsledky sekvenování po NEBNext – pokrytí lokusů; Ref – referenční vzorek, NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard, F - formamid

Lokus	Pokrytí lokusů				
	Ref_F	NS_F	MS_F	NS_NaOH	MS_NaOH
<i>MIR29B2CHG</i>	20218	4750	16932	7108	20294
<i>FHL21</i>	24540	570	20556	5538	24024
<i>FHL22</i>	25280	588	21048	5708	24392
<i>ELOVL1</i>	8788	830	17346	3688	18736
<i>ELOVL2</i>	8704	824	17132	3698	18518
<i>CCDC102B</i>	6930	29566	3558	24941	6470
<i>PDE4C</i>	11616	778	5228	652	446

Tabulka 39 Výsledky sekvenování po NEBNext – metylace cytosinu a stanovení věku; Ref – referenční vzorek, NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard, F – formamid

Lokus	Úroveň metylace (%)				
	Ref_F	NS_F	MS_F	NS_NaOH	MS_NaOH
<i>MIR29B2CHG</i>	86,56	0,55	92,37	9,91	90,20
<i>FHL21</i>	33,08	0,00	56,91	32,88	67,11
<i>FHL22</i>	35,89	0,00	56,38	18,85	70,14
<i>ELOVL1</i>	26,76	0,00	69,67	0,16	76,29
<i>ELOVL2</i>	44,32	0,00	84,13	18,34	83,25
<i>CCDC102B</i>	53,09	4,82	77,80	17,52	79,97
<i>PDE4C</i>	14,51	0,26	51,17	0,31	60,09
Predikovaný věk (roky)	32				
Skutečný věk (roky)	54				
Odchylka (roky)	22				

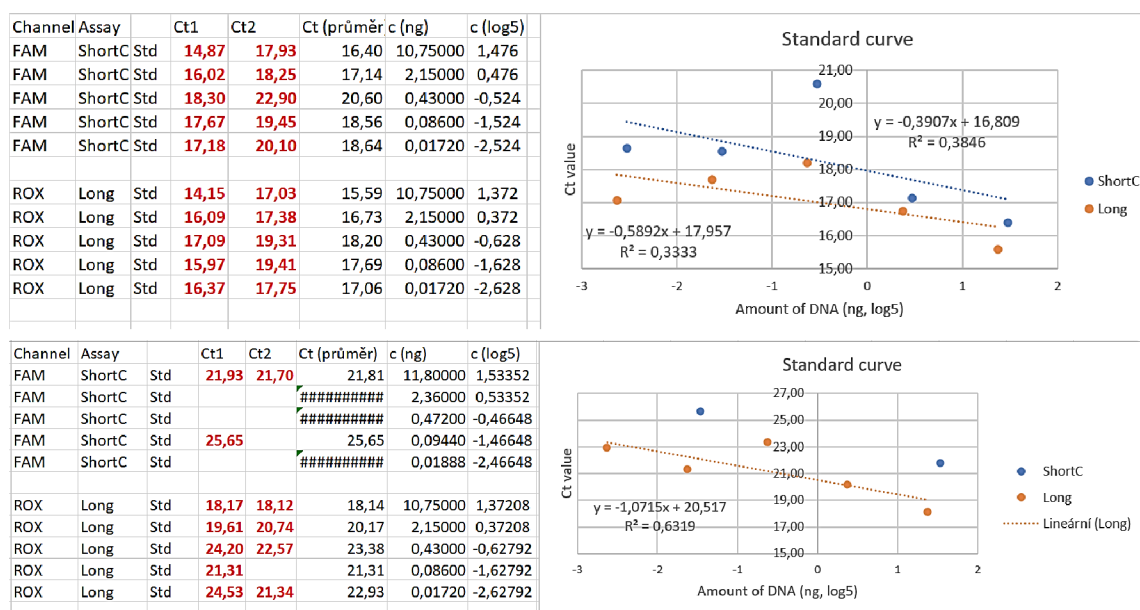
4.4 Výsledky metody BisQuE

4.4.1 Optimalizace metody

Jelikož metoda BisQuE nebyla v laboratoři doposud používána a při prvních testech s využitím laboratorního Platinum Multiplex MasterMix vyvstaly potíže se specificitou prób, bylo třeba metodu optimalizovat. Z tohoto důvodu byla provedena série optimalizačních experimentů za různých podmínek. Na optimalizaci jsem spolupracovala s Mgr. Lucií Kotkovou při elektronických konzultacích s autory článku.

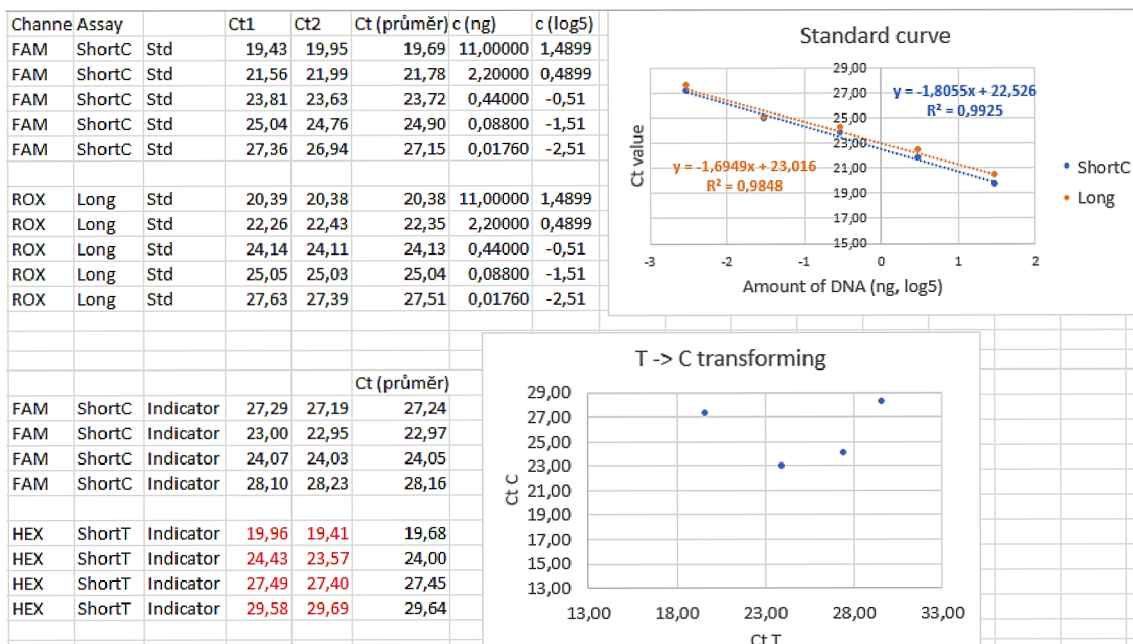
Z důvodu nízké specificity prób při využití Platinum Multiplex MasterMix byl objednána 2X PlatinumTM II Hot-Start PCR Master Mix, jenž byl přímo uveden v článku. Po provedení experimentu byly však získány falešně pozitivní hodnoty i u negativních kontrol, jež bylo třeba eliminovat. Falešně pozitivní výsledky se objevily v kanálu short-T (Ct=29) i po navýšení hořčíku na 2 mM a navýšení množství polymerasy na dvojnásobek. Z těchto důvodů byla následně přidána k polymerase DNA z lososího mlíčí, jež má potenciál zablokovat nespecifické vazby, a tím eliminovat falešně pozitivní výsledky.

Byly také provedeny experimenty s úpravou cyklu na touchdown (postupné snižování teploty hybridizace v druhém kroku PCR) ze 70 °C na 60 °C a ze 75 °C na 65 °C. Tento postup měl potenciál, co se týče větší specificity reakce. Při touchdownu ze 70 °C na 60 °C došlo k mírnému zlepšení výsledků, avšak při extrémním touchdownu z 75 °C na 65 °C nedošlo k žádné amplifikaci vyjma IPC. Pro následující experimenty jsme tedy použili touchdown 70 °C na 60 °C, avšak ačkoliv došlo ke zlepšení hodnot u negativních kontrol, začalo docházet k rozpadu standardů, kdy se objevovaly ať už úplně chybějící či nesmyslné hodnoty, viz obrázek 6.



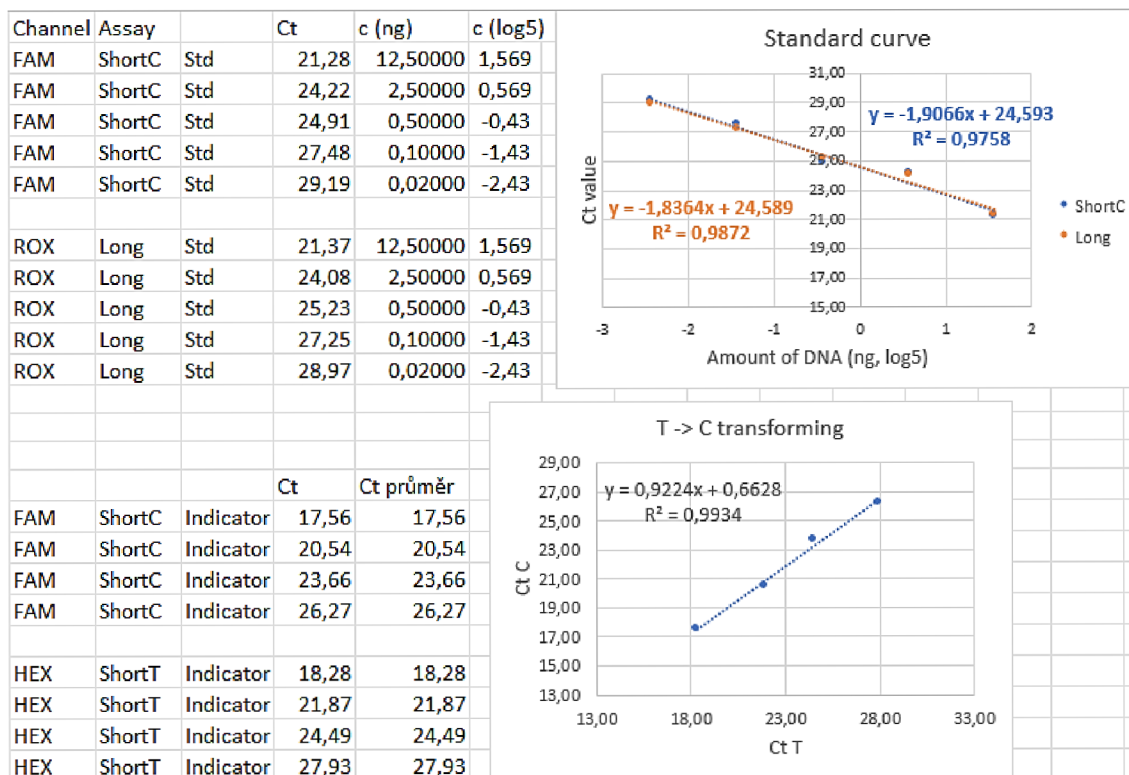
Obrázek 6 Ukázka standardů u experimentů č. 11 (výše) a 12 (níže) s podmínkami touchdown 70 °C–60 °C. Ve sloupcích Ct1 a Ct2 (duplikáty) je možné pozorovat ať už nesmyslné, či chybějící hodnoty pro standardy.

Pro experiment č. 12 byla provedena také PCR cílená na glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasu (GAPDH) pro ověření integrity standardů, přičemž bylo ověřeno, že standardy jsou v pořádku a bez kontaminace. V reakci na uvedené výsledky proběhla konzultace s autory článku, při níž bylo doporučeno pro snížení rizika kontaminace připravovat standardy v TE pufru 24 h předem. Rozhodli jsme se také upustit od touchdownu a vrátit se k PCR podmínkám dle článku. Po ověření tohoto postupu došlo při experimentu za normálních podmínek (bez touchdownu) ke zlepšení hodnot u standardů, C- a T- indikátory však vykazovaly křivku ve tvaru U, viz obrázek 7.



Obrázek 7 Ukázka standardů (výše) a C- T- indikátorů (níže) u experimentu č. 14. Standardy jsou v pořádku, avšak hodnoty Ct1 a Ct2 (duplikáty) u T-indikátoru vykazují křivku ve tvaru U.

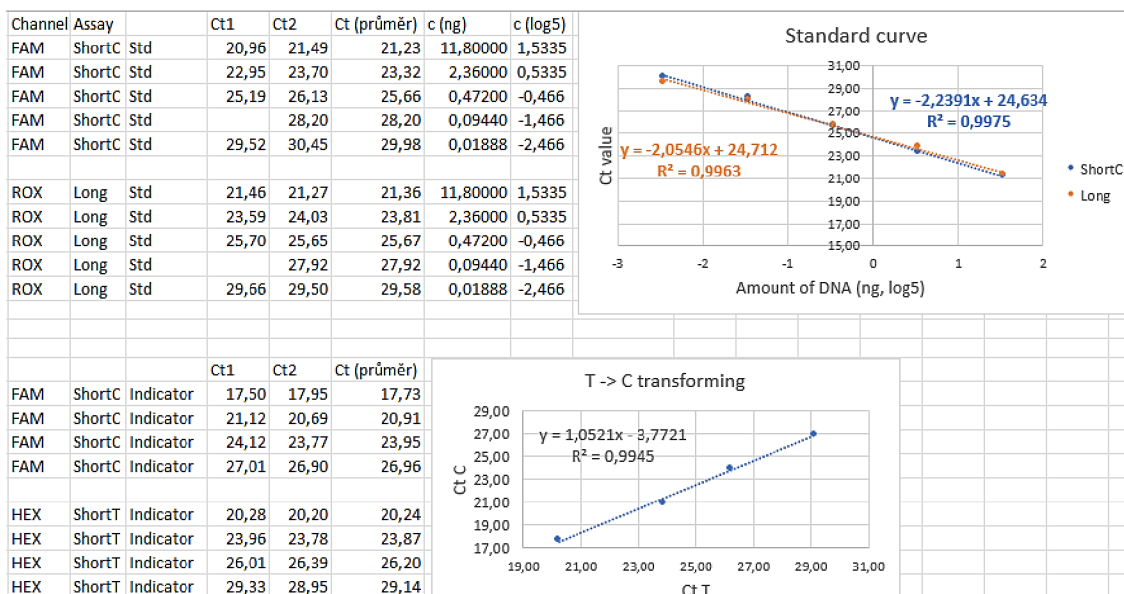
Toto bylo následně upraveno přípravou standardů i indikátorů 24 h předem a přidáním 0,8 μ l DNA z lososího mlíčí jak ke standardům, tak i k indikátorům. Poté byly při opakovaných experimentech již získány odpovídající výsledky viz obrázek 8.



Obrázek 8 Ukázka standardů (výše) a C- T- indikátorů (níže) u experimentu č. 17. Ct hodnoty u standardů i indikátorů jsou v pořádku.

4.4.2 Evaluace konverze

Po optimalizaci metody byl proveden test se vzorky po bisulfitové konverzi i NEBNext. Po provedení experimentu byly získány odpovídající křivky standardů i indikátorů, jež bylo následně možné použít pro další vyhodnocení, viz obrázek 9.



Obrázek 9 Ukázka standardů (výše) a C- T- indikátorů (níže) u experimentu pro evaluaci konverze vzorků po NEBNext a bisulfitové konverzi. Standardy i indikátory byly měřeny v duplikátech (Ct1 a Ct2). Ct hodnoty u standardů i indikátorů jsou v pořádku.

Následující tabulky poté shrnují výsledky po dosažení získaných Ct hodnot do vzorců viz obrázek 10. Vzorce pro vyhodnocení pochází z článku autorů metody (Hong & Shin, 2021).

- 1 **Conversion efficiency** $\frac{short - T}{short - C + short - T} \times 100 (\%)$
- 2 **Degradation level** $\frac{BS - DNA(short/long)}{gDNA(short/long)}$
- 3 **Recovery** $\frac{2 \times BS - DNA}{gDNA} \times 100 (\%)$

Obrázek 10 Vzorce pro vyhodnocení úspěšnosti konverze, úrovně degradace a návratnosti. Převzato z Hong & Shin, 2021(Hong & Shin, 2021)

V tabulce 40 jsou uvedeny Ct hodnoty a získané množství po dosažení do rovnic pro patientské vzorky a standardy po bisulfitové konverzi. V tomto případě byly použity standardy a vzorky starší (stáří ±3 měsíce – vzorky z 15. 11. 2023) i nově připravené (stáří 2 týdny - 7. 2. 2024). Tabulka 41 poté shrnuje vyhodnocení účinnosti konverze, degradace a návratnosti pro dané vzorky po dosažení do vzorců.

Tabulka 40 BisQuE: Ct hodnoty a odpovídající množství pro vzorky po bisulfitové konverzi. MS – metylovaný standard, NS – nemetylovaný standard, vzorek 1-5 – patientské vzorky.

Vzorek	Status	Ct hodnoty					Množství (ng)		
		Short-C	Short-T	T -*-> C	Long-C free	IPC	C	T	Long
MS_BK 7. 2.	gDNA	19,06	25,97	23,56	19,51	26,55	54,79	2,17	58,63
	BS-DNA	33,59	34,74	32,78	33,53	28,27	0,00	0,00	0,00
NS_BK 7. 2.	gDNA	22,07	41,00	39,36	22,86	27,37	6,32	0,00	4,27
	BS-DNA	35,40	34,16	32,17	30,20	28,43	0,00	0,00	0,01
MS BK 15. 11.	gDNA	19,06	25,97	23,56	19,51	26,55	54,79	2,17	58,63
	BS-DNA	34,12	33,60	31,58	41,00	28,23	0,00	0,01	0,00
NS BK 15. 11.	gDNA	22,07	41,00	39,36	22,86	27,37	6,32	0,00	4,27
	BS-DNA	33,62	33,84	31,83	41,00	28,23	0,00	0,01	0,00
Vzorek 1	gDNA	19,63	41,00	39,36	20,16	41,00	36,48	0,00	35,37
	BS-DNA	33,29	35,09	33,15	41,00	28,30	0,00	0,00	0,00
Vzorek 2	gDNA	18,24	41,00	39,36	18,40	41,00	99,08	0,00	140,39
	BS-DNA	34,84	33,92	31,92	37,67	28,26	0,00	0,01	0,00
Vzorek 3	gDNA	20,25	41,00	39,36	21,05	41,00	23,36	0,00	17,61
	BS-DNA	36,26	33,68	31,66	41,00	28,16	0,00	0,01	0,00
Vzorek 4	gDNA	19,29	41,00	39,36	19,49	41,00	46,58	0,00	59,77
	BS-DNA	33,47	35,34	33,41	41,00	28,36	0,00	0,00	0,00
Vzorek 5	gDNA	19,30	41,00	39,36	20,05	41,00	46,25	0,00	38,55
	BS-DNA	34,16	34,52	32,55	34,17	28,36	0,00	0,00	0,00

Tabulka 41 BisQuE: Účinnost konverze, degradace a návratnost pro vzorky po bisulfitové konverzi; MS – metylovaný standard, NS – nemetylovaný standard, vzorek 1-5 – patientské vzorky.

Vzorek	Status	Účinnost konverze (%)	Short/Long	Degradace	Návratnost (%)
MS_BK 7. 2.	gDNA		0,93		
	BS-DNA	64,27	4,45	4,76	0,02
NS_BK 7. 2.	gDNA		1,48		
	BS-DNA	91,08	0,36	0,24	0,15
MS BK 15. 11.	gDNA		0,93		
	BS-DNA	86,14	2742,34	2934,31	0,03
NS BK 15. 11.	gDNA		1,48		
	BS-DNA	78,35	2514,65	1698,76	0,23
Vzorek 1	gDNA		1,03		
	BS-DNA	52,58	1455,81	1411,27	0,02
Vzorek 2	gDNA		0,71		
	BS-DNA	89,11	153,26	217,15	0,01
Vzorek 3	gDNA		1,33		
	BS-DNA	96,46	2305,17	1737,69	0,06
Vzorek 4	gDNA		0,78		
	BS-DNA	51,09	1240,17	1591,40	0,02
Vzorek 5	gDNA		1,20		
	BS-DNA	76,13	7,35	6,12	0,02

Stejně byly v tabulkách 42 a 44 vyhodnoceny Ct hodnoty a množství pro vzorky po NEBNext, kdy byly hodnoceny jak starší standardy a patientské vzorky (stáří ± 3 měsíce – vzorky ze 7. 11. 2023) – tabulka 42, tak i čerstvě připravené standardy s referenčním vzorkem (stáří 1 týden), jež byly součástí experimentu pro porovnání denaturačních metod s využitím formamidu a NaOH – tabulka 44. Tyto vzorky byly měřeny v duplikátu. Tabulky 43 a 45 poté uvádí vyhodnocení účinnosti konverze, degradace a návratnosti pro uvedené vzorky.

Tabulka 42 BisQuE: Ct hodnoty a odpovídající množství pro patientské vzorky a standardy ze 7. 11. 2023 po NEBNext; MS – metylovaný standard, NS – nemetylovaný standard, vzorek 1-5 – patientské vzorky.

Vzorek	Status	Ct hodnoty				Množství (ng)		
		Short-C	Short-T	T -*-> C	Long-C free	C	T	Long
NEBNext_MS 7. 11.	gDNA	21,26	41,00	39,36	21,53	11,30	0,00	12,09
	BS-DNA	33,88	35,16	33,22	37,84	0,00	0,00	0,00
NEBNext_NS 7. 11.	gDNA	22,22	41,00	39,36	22,99	5,67	0,00	3,85
	BS-DNA	33,52	29,55	27,32	28,63	0,00	0,15	0,05
Vzorek 1	gDNA	18,92	41,00	39,36	19,98	60,77	0,00	40,72
	BS-DNA	34,32	32,58	30,51	35,03	0,00	0,01	0,00
Vzorek 2	gDNA	18,67	41,00	39,36	19,55	72,74	0,00	57,03
	BS-DNA	33,18	31,59	29,46	29,40	0,00	0,03	0,03
Vzorek 3	gDNA	19,13	41,00	39,36	20,25	52,26	0,00	32,96
	BS-DNA	31,46	32,72	30,65	31,62	0,01	0,01	0,00
Vzorek 4	gDNA	21,94	41,00	39,36	23,09	6,93	0,00	3,56
	BS-DNA	34,18	35,01	33,06	41,00	0,00	0,00	0,00
Vzorek 5	gDNA	21,59	41,00	39,36	22,03	8,92	0,00	8,17
	BS-DNA	34,70	34,19	32,20	41,00	0,00	0,00	0,00

Tabulka 43 BisQuE: Účinnost konverze, degradace a návratnost pro patientské vzorky a standardy ze 7. 11. 2023 po NEBNext; MS – metylovaný standard, NS – nemetylovaný standard, vzorek 1-5 – patientské vzorky.

Vzorek	Status	Účinnost konverze (%)	Short/Long	Degradace	Návratnost (%)
NEBNext_ MS 7. 11.	gDNA		0,93		
	BS-DNA	61,65	99,09	106,00	0,06
NEBNext_ NS 7. 11.	gDNA		1,47		
	BS-DNA	98,86	3,16	2,15	5,19
Vzorek 1	gDNA		1,49		
	BS-DNA	93,95	50,64	33,93	0,05
Vzorek 2	gDNA		1,28		
	BS-DNA	93,53	1,31	1,02	0,09
Vzorek 3	gDNA		1,59		
	BS-DNA	64,11	4,62	2,91	0,08
Vzorek 4	gDNA		1,95		
	BS-DNA	69,08	1177,35	604,97	0,10
Vzorek 5	gDNA		1,09		
	BS-DNA	85,78	1762,51	1615,51	0,11

Tabulka 44 BisQuE: Ct hodnoty a odpovídající množství pro vzorky po NEBNext s různými přístupy denaturace; R1-2 – referenční vzorek (duplikáty), NS1-2 nemetylovaný standard (duplikáty), MS1-2 metylovaný standard (duplikáty); F- formamid

Vzorek	Status	Ct hodnoty				Množství (ng)		
		Short-C	Short-T	T -*-> C	Long-C free	C	T	Long
NEBNext R1 F	gDNA	22,06	41,00	39,36	22,12	6,36	0,00	7,62
	BS-DNA	36,01	34,85	32,89	41,00	0,00	0,00	0,00
NEBNext R2 F	gDNA	22,06	41,00	39,36	22,12	6,36	0,00	7,62
	BS-DNA	33,29	32,23	30,14	30,36	0,00	0,02	0,01
NEBNext R1 NaOH	gDNA	22,06	41,00	39,36	22,12	6,36	0,00	7,62
	BS-DNA	33,22	34,28	32,29	31,62	0,00	0,00	0,00
NEBNext R2 NaOH	gDNA	22,06	41,00	39,36	22,12	6,36	0,00	7,62
	BS-DNA	34,76	33,67	31,65	41,00	0,00	0,01	0,00
NEBNext NS1 F	gDNA	22,22	41,00	39,36	22,99	5,67	0,00	3,85
	BS-DNA	36,02	30,28	28,09	29,24	0,00	0,08	0,03
NEBNext NS2 F	gDNA	22,22	41,00	39,36	22,99	5,67	0,00	3,85
	BS-DNA	38,05	28,75	26,48	27,73	0,00	0,27	0,09
NEBNext NS1 NaOH	gDNA	22,22	41,00	39,36	22,99	5,67	0,00	3,85
	BS-DNA	34,29	34,70	32,74	38,11	0,00	0,00	0,00
NEBNext NS2 NaOH	gDNA	22,22	41,00	39,36	22,99	5,67	0,00	3,85
	BS-DNA	33,89	32,51	30,43	30,14	0,00	0,02	0,01
NEBNext MS1 F	gDNA	21,26	41,00	39,36	21,53	11,30	0,00	12,09
	33,54	35,06	26,51	24,12	41,00	0,00	1,44	0,00
NEBNext MS2 F	gDNA	21,26	41,00	39,36	21,53	11,30	0,00	12,09
	BS-DNA	35,26	29,65	27,42	29,26	0,00	0,13	0,03
NEBNext MS1 NaOH	gDNA	21,26	41,00	39,36	21,53	11,30	0,00	12,09
	BS-DNA	33,52	33,46	31,43	31,68	0,00	0,01	0,00
NEBNext MS2 NaOH	gDNA	21,26	41,00	39,36	21,53	11,30	0,00	12,09
	BS-DNA	33,75	33,86	31,85	34,73	0,00	0,01	0,00

Tabulka 45 BisQuE: Účinnost konverze, degradace a návratnost pro vzorky po NEBNext s různými přístupy denaturace; R1-2 – referenční vzorek (duplikáty), NS1-2 nemetylovaný standard (duplikáty), MS1-2 metylovaný standard (duplikáty), F- formamid

Vzorek	Status	Účinnost konverze (%)	Short/Long	Degradace	Návratnost (%)
NEBNext R1 F	gDNA		0,84		
	BS-DNA	90,38	1015,58	1216,16	0,09
NEBNext R2 F	gDNA		0,84		
	BS-DNA	90,60	1,76	2,11	0,66
NEBNext R1 NaOH	gDNA		0,84		
	BS-DNA	66,05	1,38	1,65	0,19
NEBNext R2 NaOH	gDNA		0,84		
	BS-DNA	90,33	2480,37	2970,26	0,22
NEBNext NS1 F	gDNA		1,47		
	BS-DNA	99,67	2,91	1,98	2,96
NEBNext NS2 F	gDNA		1,47		
	BS-DNA	99,98	2,83	1,92	9,39
NEBNext NS1 NaOH	gDNA		1,47		
	BS-DNA	75,35	141,84	96,40	0,14
NEBNext NS2 NaOH	gDNA		1,47		
	BS-DNA	92,31	1,18	0,80	0,59
NEBNext MS1 F	gDNA		0,93		
	BS-DNA	99,96	501779,51	536753,59	25,54
NEBNext MS2 F	gDNA		0,93		
	BS-DNA	99,64	4,77	5,10	2,39
NEBNext MS1 NaOH	gDNA		0,93		
	BS-DNA	81,78	2,17	2,32	0,16
NEBNext MS2 NaOH	gDNA		0,93		
	BS-DNA	79,65	17,94	19,19	0,12

V rámci vyhodnocení je možné pozorovat, že u sondy Short-T správně chyběly v rámci genomické DNA (gDNA) hodnoty Ct, neboť se tato sonda váže právě na konvertovanou DNA, nikoliv na nekonvertovanou. Místo chybějících hodnot pak bylo doplněno číslo 41 jako číslo prvního neexistujícího cyklu, jelikož metoda sestává právě z 40 cyklů, aby bylo možné výsledky dále vyhodnotit. U výsledků po bisulfitové konverze bylo dosaženo účinnosti konverze v rozmezí 51-91 % s průměrem 76,13 %, u výsledků pro NEBNext bylo dosaženo účinnosti konverze v rozmezí 61-99 %

s průměrem 85,93 %. Co se tedy týče účinnosti konverze, u metody NEBNext byla obecně naměřena konverze vyšší. U patientských vzorků pak bylo možné pozorovat velké rozdíly v účinnosti konverze. Při srovnání vzorků po NEBNext s různými denaturačními přístupy bylo také možné pozorovat, že účinnost konverze byla u vzorků po denaturaci formamidem obecně vyšší (průměrně 96,71 %) než u vzorků po denaturaci NaOH (průměrně 80,91 %).

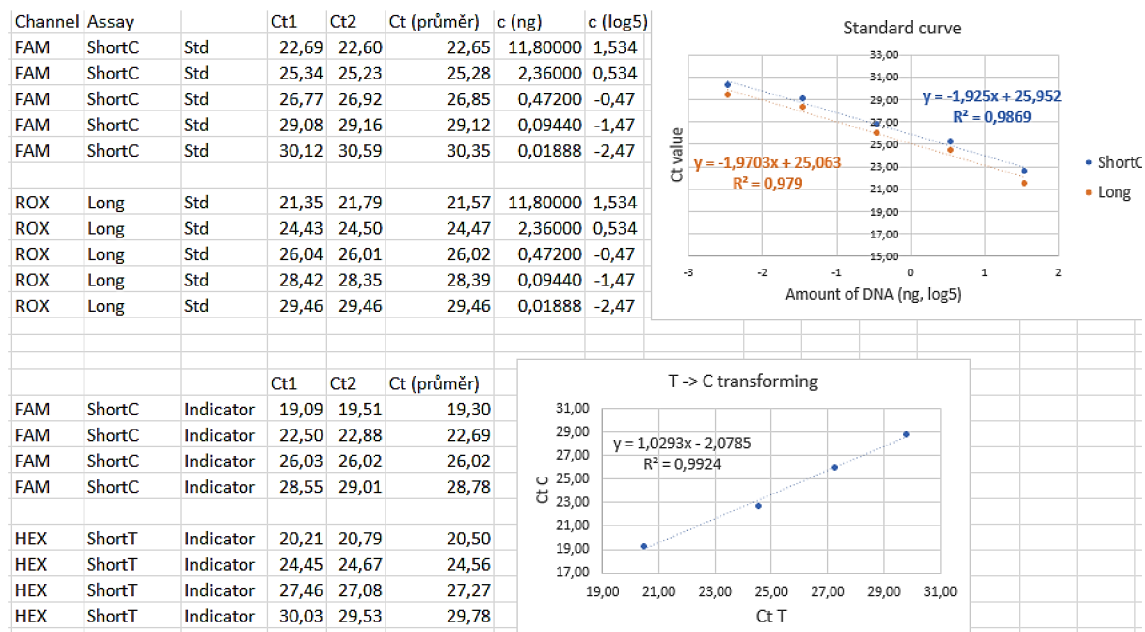
Vyhodnocení degradace je závislé na poměru krátkých (Short-C a Short-T) ku dlouhým (Long-C free) amplikonům pro konvertovanou i genomickou DNA. Je-li tento poměr >1 , výsledek naznačuje, že během konverze byla DNA degradována. Jelikož u některých vzorků (například MS BK 15. 11. – BS-DNA či vzorek 1 – BS-DNA) nebyly naměřeny Ct hodnoty pro Long-C free próbu, byly po doplnění hodnoty „41“ dosaženy vysoké podíly Short/Long a posléze také vysoká úroveň degradace. Lze se domnívat, že Long-C free próba nebyla u těchto vzorků amplifikována kvůli vysoké degradaci dlouhých fragmentů. Tento jev se objevil jak u vzorků po bisulfitové konverzi, tak i u vzorků po NEBNext. V rámci bisulfitové konverze jej bylo možné pozorovat téměř u všech vzorků i standardů s výjimkou nově připravených standardů; u NEBNext se vyskytoval různě u nových i připravených vzorků i standardů. Podařilo-li se získat Ct hodnoty pro Long-C free, úroveň degradace byla značně snížena na 0,24-6,12 pro NEBNext i bisulfitovou konverzi. Výsledky nižší než 1 naznačují, že DNA degradována nebyla, takové hodnoty byly však u obou metod získány vždy pouze u jednoho vzorku. Zbýlé výsledky tedy naznačují, že u vzorků došlo k nadměrné degradaci.

Úroveň návratnosti byla obecně velmi nízká v rozmezí 0,01-0,66 %, výjimkou byly pouze nemetylované standardy po NEBNext, konkrétně nemetylovaný standard ze 7. 11. 2023 (denaturace NaOH) a standardy novější po denaturaci formamidem, kde bylo dosaženo hodnot až 25,54 %. Paradoxně nově připravené nemetylované standardy po denaturaci NaOH vykazovaly opět nízkou úroveň návratnosti.

4.4.3 Evaluace konverze - porovnání amplifikačních přístupů

V rámci diplomové práce byl proveden ještě další experiment, v němž byl srovnán referenční vzorek s metylovaným a nemetylovaným standardem po bisulfitové konverzi. Pro samotnou konverzi byly však zvoleny různé amplifikační přístupy, kdy byla použita standardní metoda a také dvě další, jež byly uvedeny v příručce od výrobce ke konverzní

soupravě. Na obrázku 11 je možné vidět, že standardy i indikátory byly v pořádku a bylo možné získat křivky i odpovídající rovnici a hodnotu R^2 .



Obrázek 11 Ukázka standardů (výše) a C- T- indikátorů (níže) u experimentu pro evaluaci konverze vzorků po bisulfitové konverzi s rozdílnými amplifikačními přístupy. Standardy i indikátory byly měřeny v duplikátech (Ct1 a Ct2). Ct hodnoty u standardů i indikátorů jsou v pořádku.

Ct hodnoty a dosažené množství pro všechny vzorky je možné sledovat v tabulce 46, tabulka 47 pak shrnuje vyhodnocení účinnosti konverze, degradace a návratnosti. V tabulce je možné pozorovat chybějící hodnoty u Short-C pro konvertované vzorky a chybějící hodnoty pro Short-T pro genomickou DNA. Jedná se přitom o ideální výsledky, které naznačují, že DNA byla 100% konvertována, neboť Short-C sonda se váže na konvertované vzorky pouze v případě, pokud obsahují zbytky genomické DNA, tj. nejsou konvertovány ze 100 %. Pro účely vyhodnocení pak byla do prázdných polí opět vložena hodnota 41. V tabulce je možné také u všech referenčních vzorků pozorovat chybějící hodnotu IPC, správně by však mělo být IPC přítomno v konvertovaných i genomických vzorcích. V rámci předchozích výsledů po bisulfitové konverzi bylo přitom u referenčních vzorků IPC správně detekováno. Jelikož nebyl experiment zopakován, lze se pouze domnívat, zda se jednalo o chybu v přípravě vzorku či metodě.

Výsledky úrovně degradace v rozmezí 0,78-3,00 byly v tomto případě velmi podobné výsledkům předchozího experimentu, tentokrát se však podařilo získat Ct hodnoty pro Long-C free próbu u všech vzorků a bylo tedy možné pro všechny vzorky degradaci vyhodnotit. Bylo také možné pozorovat mnohem vyšší úroveň návratnosti

v rozmezí 26,98-102,42 % (průměrně 61,73 %). Jelikož je výpočet návratnosti závislý na hodnotách pro Short-C, lze se domnívat, že tyto oproti předchozím experimentům vysoké hodnoty byly dosaženy díky 100% konverzi DNA, a tedy dosazenou hodnotou Ct = 41. Mezi výsledky pro jednotlivé metody však nebylo možné pozorovat žádné obecně „lepší“ výsledky, jež by napovídaly, že je daná metoda pro vzorky více vhodná.

Tabulka 46 BisQuE: Ct hodnoty a množství pro referenční vzorek a standardy po aplikaci tří různých metod amplifikace při bisulfitové konverzi, čísla 1 a 2 označují dva alternativní přístupy; Ref – referenční vzorek, MS – metylovaný standard, NS – nemetylovaný standard

Vzorek	Status	Ct hodnoty					Množství (ng)		
		Short-C	Short-T	T -*-> C	Long-C free	IPC	C	T	Long
Ref	gDNA	22,08	41,00	40,12	21,24	41,00	25,46	0,00	22,71
	BS-DNA	41,00	25,12	23,78	24,06	27,79	0,00	6,16	2,27
Ref 1	gDNA	22,08	41,00	40,12	21,24	41,00	25,46	0,00	22,71
	BS-DNA	41,00	24,32	22,95	23,48	27,63	0,00	12,26	3,64
Ref 2	gDNA	22,08	41,00	40,12	21,24	41,00	25,46	0,00	22,71
	BS-DNA	41,00	24,76	23,41	23,46	27,62	0,00	8,40	3,70
NS	gDNA	23,08	41,00	40,12	23,02	28,13	11,04	0,00	5,31
	BS-DNA	41,00	25,22	23,88	23,54	27,38	0,00	5,65	3,47
NS 1	gDNA	23,08	41,00	40,12	23,02	28,13	11,04	0,00	5,31
	BS-DNA	41,00	26,77	25,48	25,58	28,80	0,00	1,49	0,66
NS 2	gDNA	23,08	41,00	40,12	23,02	28,13	11,04	0,00	5,31
	BS-DNA	41,00	25,92	24,60	25,09	28,69	0,00	3,09	0,98
MS	gDNA	22,21	41,00	40,12	21,29	29,40	22,84	0,00	21,80
	BS-DNA	41,00	25,51	24,18	24,35	28,33	0,00	4,40	1,79
MS 1	gDNA	22,21	41,00	40,12	21,29	29,40	22,84	0,00	21,80
	BS-DNA	41,00	24,76	23,41	23,74	29,69	0,00	8,40	2,95
MS 2	gDNA	22,21	41,00	40,12	21,29	29,40	22,84	0,00	21,80
	BS-DNA	41,00	25,27	23,93	23,46	29,56	0,00	5,41	3,70

Tabulka 47 BisQuE: Účinnost konverze, degradace a návratnost pro referenční vzorek a standardy po aplikaci tří různých metod amplifikace při bisulfitové konverzi, čísla 1 a 2 označují dva alternativní přístupy; Ref – referenční vzorek, MS – metylovaný standard, NS – nemetylovaný standard

Vzorek	Status	Účinnost konverze (%)	Short/Long	Degradace	Návratnost (%)
Ref	gDNA		1,12		
	BS-DNA	100,00	2,71	2,42	48,38
Ref 1	gDNA		1,12		
	BS-DNA	100,00	3,36	3,00	96,31
Ref 2	gDNA		1,12		
	BS-DNA	100,00	2,27	2,02	65,95
NS	gDNA		2,08		
	BS-DNA	100,00	1,63	0,78	102,42
NS 1	gDNA		2,08		
	BS-DNA	100,00	2,27	1,09	26,98
NS 2	gDNA		2,08		
	BS-DNA	100,00	3,16	1,52	56,08
MS	gDNA		1,05		
	BS-DNA	100,00	2,46	2,35	38,56
MS 1	gDNA		1,05		
	BS-DNA	100,00	2,85	2,72	73,52
MS 2	gDNA		1,05		
	BS-DNA	100,00	1,46	1,40	47,40

5 DISKUSE

Metylaci cytosinu řadíme mezi významné epigenetické regulační mechanismy genové exprese. Tento jev je společný pro všechny organismy včetně bakterií, rostlin a savců a jeho správný průběh je klíčový pro růst a vývoj organismu a udržení stability genomu. Dochází při něm k přenosu metylové skupiny DNA metyltransferasami na cílové místo na rozvinutém chromatinovém vlákne DNA pod kontrolou opravných DNA mechanismů, donorem metylové skupiny je přitom S-adenosyl-L-metionin. Patologická exprese těchto metylačních enzymů přitom může znamenat rozvoj různých forem onemocnění, kam můžeme zařadit například onemocnění autoimunitní (Li *et al.*, 2021), onkologická (Jin & Robertson, 2013), dále neurologická, jako je například Alzheimerova a Parkinsonova choroba a amyotrofická laterální skleróza (Rasmi *et al.*, 2022; Younesian *et al.*, 2022), genetické poruchy a metabolické poruchy a další.

V souvislosti s rozšiřujícím se výzkumem v oblasti epigenetiky a metylace DNA přichází nové technologie a postupy pro dekódování metylačních znaků a hledání souvislostí se zdravotním stavem původce. Byl také prokázán význam metylace cytosinu pro stanovení věku z krve i jiných tělních tekutin, čehož může být využito i v rámci forenzních věd a vyšetřování kriminálních případů. Forenzní vědy využívají při vyšetřování široké spektrum metod, do kterého řadíme identifikaci tkání a tělních tekutin, profilování pomocí krátkých tandemových repetitivních sekvencí, epigenetické změny v DNA, kam řadíme zejména analýzu metylačních vzorců a další (Rana, 2018). Jako klíčový důkaz ve fázi vyšetřování se přitom může jevit také stanovení věku, jež nám umožní zúžit výběr potenciálních pachatelů či identifikovat oběť. Za zlatý standard je v tomto ohledu považována bisulfitová konverze, jež navzdory vysokým ztrátám DNA v průběhu reakce umožňuje stanovit věk s přesností v rozpětí nižších jednotek let pro krevní i spermatické vzorky (Bekaert *et al.*, 2015; Correia Dias *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2018; Pisarek *et al.*, 2021). Jelikož bylo cílem diplomové práce mimo jiné porovnat výsledky bisulfitové konverze s alternativní konverzní metodou NEBNext, byla nejprve aplikována právě bisulfitová metoda na patientské vzorky o rozpětí věku 23-57 let a standardy, jejichž úroveň metylace byla nejprve potvrzena metodou metyl-specifické PCR.

Při prvním experimentu bylo dosaženo stanovení věku s přesností 4,4 let, přičemž nejpřesněji se podařilo odhadnout věk u původců v rozmezí 40-50 let věku, nejnížší

přesnost stanovení byla naopak u původce ve věku 23 let. Po zopakování experimentu bylo dosaženo přesnosti 2,5 let, přičemž nejpřesněji se opět podařilo stanovit věk u původců v rozpětí 40-50 let věku, nejnižší přesnost stanovení byla opět u původce ve věku 23 let. Tyto výsledky odpovídají výsledkům jiných skupin zaměřující se na stanovení věku z krve pomocí bisulfitační reakce, například skupina Bekaert *et al.* sledovala lokusy *ASPA*, *PDE4C*, *ELOVL2* a *EDARADD* na 206 krevních vzorcích původců o širokém věkovém rozpětí 0-91 let, podařilo se přitom stanovit věk s přesností 3,8 let (Bekaert *et al.*, 2015). Při zaměření na konkrétní věkové kategorie však tato skupina získala nejvyšší přesnost u osob mladších 20 let, s věkem 60 a více let byla pak výrazně snížena. Přesnost stanovení věku klesající se vzrůstajícím věkem byla pozorována u více studií využívajících modely zacílené na obdobné lokusy (například model Zbieć-Piekarska využívající lokusy *ELOVL2*, *MIR29B2CHG*, *TRIM59*, *KLF14* a *FHL2*), důvodem přitom mohou být například environmentální a populační faktory, neboť byla u jistých lokusů prokázána jejich rozdílná korelace v závislosti na testované populaci (Al-Ghanmy *et al.*, 2021; Cho *et al.*, 2017; Thong *et al.*, 2017; Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015). Jelikož byly mé experimenty zaměřeny pouze na malou sadu vzorků, bylo by třeba pro vyšší odpovídající hodnotu provést opakování také s vyšším zastoupením všech věkových kategorií. V obou experimentech také nebyl dostatečně osekvenován lokus *PDE4C*, jehož výsledky jsou součástí vyhodnocovacího vzorce a jehož nedostatečným pokrytím mohlo dojít ke zkreslení výsledků. Jelikož tento lokus nebyl dostatečně osekvenován ani u metody NEBNext, je možné se domnívat, že nedostatečné pokrytí mohlo být způsobeno nedostatečnou PCR amplifikací daného lokusu a lepší výsledky by bylo možné získat navýšením množství potřebného primeru v PCR mixu. V rámci všech experimentů využívajících bisulfitovou konverzi byly také zjištěny vysoké ztráty DNA dosahující hodnot přesahujících 90 %. Tyto ztráty neodpovídají hodnotám uvedeným přímo v protokolu od výrobce soupravy, kde je uvedena návratnost až 75 %. Při provedení experimentu byly však dodrženy veškeré postupy, vstupní množství DNA (100 ng) také odpovídalo doporučením výrobce (500 pg-2 µg DNA). Ztráty DNA však odpovídají ztrátám dosaženým jinými vědeckými skupinami (Grunau *et al.*, 2001; Kresse *et al.*, 2023).

Dalším krokem bylo otestování metody NEBNext, jež slouží ke stanovení věku na podobném principu jako bisulfitová konverze. Dochází přitom stejně jako u bisulfitové konverze k přeměně nemetylovaného cytosinu na uracil s následnou amplifikací

na tymin, zatímco metylovaný cytosin zůstává beze změny. Na rozdíl od bisulfitační reakce však nedochází k přeměně vlivem chemických, ale enzymatických reakcí (Vaisvila *et al.*, 2021). Jelikož při bisulfitové konverzi dochází k vysokým ztrátám DNA, byla tato metoda otestována s potenciálem nižších ztrát genetického materiálu, případně také lepších výsledků při samotném stanovení věku. NEBNext byl otestován na stejné sadě patientských vzorků a standardů opět ve dvou opakováních. V prvním experimentu bylo dosaženo velkých odchylek u stanovení věku, kdy u původce ve věku 23 let bylo dosaženo odchylky 10 let, u původce ve věku 41 let poté odchylky 2 let, jednalo se tedy celkově o mnohem větší věkové rozpětí než u bisulfitové konverze. V průměru se podařilo stanovit věk s přesností 7 let, nejpřesněji byl určen věk u původce ve věku 41 let. Při druhém opakování byl posléze stanoven věk s přesností 5 let, přičemž nejpřesněji se podařilo stanovit věk u původců v rozmezí 37-41 let, naopak nejnižší přesnost bylo možné pozorovat u původců ve věku 23 a 47 let. Ačkoliv se v rámci druhého experimentu podařilo stanovit věk s vyšší přesností, jednalo se stále o horší výsledky než u bisulfitové konverze. Jelikož se mi nepodařilo dohledat články věnující se stanovení věku s využitím této konverzní soupravy, nelze výsledky porovnat. Souprava byla však již úspěšně využívána pro celogenomové metylační analýzy (Morrison *et al.*, 2021).

Po provedení samotné konverze byly navzdory dodržení doporučených postupů naměřeny vysoké ztráty DNA (až ve výši 97 %). Z tohoto důvodu jsme se rozhodli dle doporučení výrobce přistoupit k obměně denaturační metody z NaOH na formamid. Aplikací formamidu bylo dosaženo snížení ztrát o přibližně 2 %, stále se však jednalo o vysoké ztráty převyšující hodnoty u bisulfitové konverze. Vzorky po odlišné denuraci byly také osekvenovány, přičemž po analýze sekvančních výsledků bylo možné sledovat, že pokrytí lokusu *PDE4C* bylo u vzorků denaturovaných formamidem lepší než u vzorků denaturovaných NaOH. V rámci metylace cytosinu bylo možné pozorovat různé výsledky. Ačkoliv u nemetylovaného standardu byly dosaženy obecně lepší výsledky u denaturace formamidem a u metylovaného standardu naopak u denaturace NaOH, v případě obou denaturačních přístupů byly hodnoty metylace u metylovaných standardů nízké. Naopak u nemetylovaného standardu byla detekována falešná pozitivita, jež byla však u denaturace NaOH mnohem vyšší. U referenčního vzorku podrobeného denuraci formamidem byl stanoven věk s vysokou odchylkou 22,5 let. Experiment se však nepodařilo zopakovat, nelze tedy s určitostí říci, zda byla tato odchylka způsobena změnou denaturační metody.

V rámci experimentů u bisulfitové konverze i NEBNext byla detekována falešná pozitivita u nemetylovaného standardu. Jelikož byly u nemetylovaného standardu ověřeny správné hodnoty metylace v rozsahu 0,00-1,14 %, bylo třeba se zaměřit na jiné potenciální příčiny. Mezi tyto příčiny je teoreticky možné zařadit kontaminaci DNA, dále nedostatečné sekvenační pokrytí či bisulfitační artefakty, k jejichž tvorbě dochází při nedostatečně proběhlé konverzní reakci, a jež by mohly reagovat s komponenty následujících reakcí a tím poskytovat falešný signál. Pro ověření účinnosti konverze a stanovení degradace a návratnosti byla proto optimalizována metoda BisQuE (Hong & Shin, 2021), jež funguje na principu kvantitativní PCR.

U vzorků po bisulfitové konverzi bylo v rámci prvního experimentu dosaženo účinnosti konverze v rozmezí 51-91 %, u druhého experimentu bylo dosaženo konverze 100 % pro všechny vzorky. U vzorků po NEBNext bylo v prvním experimentu dosaženo účinnosti konverze v rozmezí 61-99 %. Ačkoliv tedy v prvním experimentu byla naměřena účinnost konverze vyšší pro NEBNext, v rámci druhého experimentu pouze s bisulfitovou konverzí bylo dosaženo konverze 100 %, což odpovídá také informacím uvedeným v příručce výrobce bisulfitační soupravy. Výrobce soupravy NEBNext přitom účinnost konverze neuvádí. Autoři metody BisQuE uvádí účinnost konverze 99,90 % u bisulfitační soupravy (EZ-DNA) a 94,24 % u NEBNext soupravy. V případě bisulfitové konverze tedy byla mnou získaná účinnost v prvním experimentu nižší než v publikaci, u druhého experimentu odpovídaly hodnotám od autorů publikace. V případě NEBNext záleželo na konkrétním vzorku, většina vzorků však dosahovala uspokojivých hodnot kolem 90 % účinnosti konverze.

Dále byla také stanovena degradace, jejíž vyhodnocení je závislé na poměru krátkých (Short-C a Short-T) ku dlouhým (Long-C free) amplikonům pro konvertovanou i genomickou DNA. Je-li tento poměr >1 , výsledek naznačuje, že během konverze byla DNA degradována. Jelikož v prvním experimentu nebyly u několika vzorků získány Ct hodnoty pro Long-C free próbu, což mohlo být způsobeno vysokou degradací dlouhých fragmentů, byly u těchto vzorků získány nadměrně vysoké hodnoty degradace. Vezmeme-li v potaz pouze vzorky s hodnotami pro Long-C free próbu, u nichž bylo možné degradaci správně vyhodnotit, bylo v rámci prvního experimentu dosaženo degradace na úrovni 0,24-6,12 pro NEBNext i bisulfitovou konverzi, v rámci druhého experimentu se vzorky pouze po bisulfitové konverzi bylo dosaženo velmi podobných

hodnot 0,78-3,00 a degradaci se oproti prvnímu experimentu podařilo vyhodnotit u všech vzorků. Úroveň degradace uvedená autory BisQuE byla u bisulfitační soupravy 1,49, u NEBNext soupravy poté 0,86, což naznačuje, že během NEBNext konverze k degradaci nedošlo. Mnou naměřené hodnoty naznačují, že kromě jednoho vzorku u každé metody došlo u všech vzorků v určité míře k degradaci DNA, neboť bylo dosaženo degradace >1.

Úroveň návratnosti byla v rámci prvního experimentu velmi nízká v rozmezí 0,01-0,66 %, výjimkou bylo pouze několik vzorků, kde bylo dosaženo hodnot až 25,54 %. Úroveň návratnosti byla dle autorů 50,58 % u bisulfitační soupravy a 18,24 % u NEBNext. Mnou získaná úroveň návratnosti tedy byla u naprosté většiny vzorků mnohem nižší, ačkoliv výrobce bisulfitační soupravy uvádí návratnosti až 75 %. Potenciálně mohly být nízké % návratnosti a vysoká úroveň degradace u prvního BisQuE experimentu způsobeny dlouhou přípravou reakce spojenou s možnou degradací vzorku či sond. Usuzuji na to z toho, že při následujícím experimentu se vzorky po bisulfitové konverzi, jehož příprava trvala kvůli nižšímu počtu vzorků kratší čas, bylo dosaženo mnohem vyšší úrovně návratnosti (v rozmezí 27-102 %), což by také více odpovídalo výsledkům autorů metody. Jelikož však nebyly provedeny další experimenty, nelze tento vliv potvrdit ani vyloučit. Stejně tak není možné tyto výsledky porovnat s jinými vědeckými skupinami, neboť kromě autorů metody nebyla na téma BisQuE doposud sepsána jiná publikace.

Po shrnutí všech dosažených výsledků lze dospět k závěru, že se bisulfitová konverze stále jeví jako vhodnější metoda pro stanovení věku z krve a pro analýzu metylace cytosinu než NEBnext, neboť dosahuje nižších ztrát a vyšší účinnosti konverze i přesnosti ve stanovení věku. Nepopírají však potenciál metody NEBNext, jenž je třeba dále prozkoumat a metodu optimalizovat. V případě této metody je však třeba se zaměřit na ztráty DNA po samotné konverzi a na analýzu větší sady vzorků, aby mohla být přesněji zhodnocena schopnost metody stanovit věk z krve. Dále bude třeba prozkoumat možnosti zvýšení konverzní účinnosti a návratnosti po zhodnocení metodou BisQuE.

6 ZÁVĚR

V teoretické části práce byla vypracována literární rešerše na téma epigenetických modifikací, metylace cytosinu, biomarkerů stárnutí a metod analýzy metylace DNA. V praktické části jsem se poté zaměřila na přípravu vlastního metylovaného a nemetylovaného standardu, dále na zavedení metody NEBNext do laboratorní praxe a porovnání jejích výsledků s bisulfitací reakcí, jež se v laboratoři běžně používá.

Úspěšně jsem připravila nemetylovaný standard o 0,00 % metylace a metylovaný standard, jenž nejprve dosahoval 16,4 % metylace, po navýšení inkubační doby a vstupního množství enzymu se však podařilo připravit standard dosahující 95,00 % metylace, jenž mohl být používán v dalších experimentech. Následně byla v celkem dvou opakováních provedena bisulfitová konverze na sadě pěti patientských vzorků a standardů. Konvertované vzorky byly posléze podrobeny sérii dalších metod pro stanovení věku z krve, přičemž se podařilo stanovit věk s přesností 4,4 let, při opakování experimentu pak 2,5 let, což odpovídá výsledkům získaným jinými vědeckými skupinami. Průměrné ztráty DNA po konverzi se pohybovaly okolo 90 %.

Dále byla na stejné sadě patientských vzorků a standardů otestována metoda NEBNext, při stanovení věku se přitom podařilo dosáhnout přesností 5,0, při opakování experimentu pak 7,0 let. Docházelo však k vysokým ztrátám DNA (až ve výši 97 %). Z tohoto důvodu byl následně proveden experiment s alternativní denaturační metodou pomocí formamidu, přičemž byly sníženy ztráty DNA na 95 %, stále se však jednalo o vyšší ztráty než u bisulfitové konverze. Po vyhodnocení sekvenačních výsledků bylo také možné pozorovat, že zatímco u nemetylovaných standardů bylo dosaženo lepších výsledků u denaturace formamidem, u metylovaných standardů bylo dosaženo lepších výsledků u denaturace NaOH. V obou případech byly však hodnoty u metylovaných standardů nízké a byla detekována falešná pozitivita u nemetylovaných standardů, což mohlo být způsobeno také nedostatečnou konverzí DNA. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli optimalizovat novou metodu BisQuE, jež může sloužit k evaluaci účinnosti konverze ve vzorcích po bisulfitové či alternativní konverzi.

Při prvním vyhodnocení metody BisQuE bylo u výsledků po bisulfitové konverzi dosaženo účinnosti konverze v rozmezí 51-91 %, u výsledků pro NEBNext bylo dosaženo účinnosti konverze v rozmezí 61-99 %. U metody NEBNext byla tedy obecně naměřena konverze vyšší. Při srovnání vzorků po NEBNext s různými denaturačními přístupy bylo

také možné pozorovat, že účinnost konverze byla u vzorků po denaturaci formamidem obecně vyšší (průměrně 96,7 %) než u vzorků po denaturaci NaOH (průměrně 80,9 %). Podařilo-li se naměřit hodnoty pro Long-C free próbu, byla detekována degradace v rozmezí 0,24-6,12, byla však detekována také velmi nízká úroveň návratnosti v rozmezí 0,01-0,66 %, pouze několika vzorků byla získána návratnosti vyšší (až 25,54 %), což neodpovídalo publikaci autorů metody. Tyto nižší hodnoty účinnosti konverze a návratnosti mohly být potenciálně způsobeny dlouhou přípravou reakce, neboť v rámci druhého experimentu se vzorky po bisulfitové konverzi, kde byla příprava reakce mnohem kratší, neboť sestávala z méně vzorků, byla DNA 100% konvertována a bylo dosaženo návratnosti v rozmezí 26,98-102,42 %. Degradace také byla v tomto případě snížena na 0,78-3,00 a bylo možné ji vyhodnotit u všech vzorků. Při porovnání hodnot pro jednotlivé amplifikační metody však nebylo možné pozorovat žádný obecně lepší výsledek, jenž by naznačoval, že je daná amplifikační metoda pro DNA více vhodná.

Na základě všech dosažených výsledků je možné usoudit, že metody NEBNext i bisulfitová konverze mohou sloužit ke stanovení věku z krve. Při bisulfitové konverzi však bylo dosaženo nižších ztrát DNA a byl také stanoven věk s vyšší přesností. Účinnost bisulfitové konverze také při druhém experimentu BisQuE dosáhla 100 %, což odpovídá také hodnotám získaným autory metody. Získané poznatky napovídají, že se bisulfitová konverze jeví jako vhodnější metoda pro analýzu metylace cytosinu a stanovení věku z krve. V případě alternativní metody NEBNext bude třeba dále prozkoumat možnosti snížení ztrát DNA po konverzi a navýšení účinnosti konverze a návratnosti. Dále bude třeba analyzovat její přesnost ve stanovení věku na větší sadě vzorků.

7 LITERATURA

- Aberg, K. A., McClay, J. L., Nerella, S., Clark, S., Kumar, G., Chen, W., Khachane, A. N., Xie, L., Hudson, A., Gao, G., Harada, A., Hultman, C. M., Sullivan, P. F., Magnusson, P. K. E., & van den Oord, E. J. C. G. (2014). Methylome-wide association study of schizophrenia: Identifying blood biomarker signatures of environmental insults. *JAMA Psychiatry*, *71*(3), 255–264. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.3730>
- Aberg, K. A., McClay, J. L., Nerella, S., Xie, L. Y., Clark, S. L., Hudson, A. D., Bukszár, J., Adkins, D., Swedish Schizophrenia Consortium, Hultman, C. M., Sullivan, P. F., Magnusson, P. K. E., & van den Oord, E. J. C. G. (2012). MBD-seq as a cost-effective approach for methylome-wide association studies: Demonstration in 1500 case--control samples. *Epigenomics*, *4*(6), 605–621. <https://doi.org/10.2217/epi.12.59>
- Aberg, K. A., Xie, L., Chan, R. F., Zhao, M., Pandey, A. K., Kumar, G., Clark, S. L., & Oord, E. J. C. G. van den. (2015). Evaluation of Methyl-Binding Domain Based Enrichment Approaches Revisited. *PLOS ONE*, *10*(7), e0132205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132205>
- Ahuja, N., Li, Q., Mohan, A. L., Baylin, S. B., & Issa, J. P. (1998). Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Research*, *58*(23), 5489–5494.
- Babenko, V. N., Chadaeva, I. V., & Orlov, Y. L. (2017). Genomic landscape of CpG rich elements in human. *BMC Evolutionary Biology*, *17*(Suppl 1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0864-0>
- Bacalini, M. G., Boattini, A., Gentilini, D., Giampieri, E., Pirazzini, C., Giuliani, C., Fontanesi, E., Remondini, D., Capri, M., Del Rio, A., Luiselli, D., Vitale, G., Mari, D., Castellani, G., Blasio, A., Salvioli, S., Franceschi, C., & Garagnani, P. (2015). A meta-analysis on age-associated changes in blood DNA methylation: Results from an original analysis pipeline for Infinium 450K data. *Aging*, *7*. <https://doi.org/10.18632/aging.100718>
- Baker, G. T., & Sprott, R. L. (1988). Biomarkers of aging. *Experimental Gerontology*, *23*(4–5), 223–239. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(88\)90025-3](https://doi.org/10.1016/0531-5565(88)90025-3)
- Baylin, S. B. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*, *2*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncponc0354>
- Bekaert, B., Kamalandua, A., Zapico, S. C., Van de Voorde, W., & Decorte, R. (2015). Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics*, *10*(10), 922–930. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1080413>
- Benetos, A., Okuda, K., Lajemi, M., Kimura, M., Thomas, F., Skurnick, J., Labat, C., Bean, K., & Aviv, A. (2001). Telomere length as an indicator of biological aging: The gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *37*(2 Pt 2), 381–385. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.37.2.381>
- Berdyshev, G. D., Korotaev, G. K., Boiarskikh, G. V., & Vaniushin, B. F. (1967). [Nucleotide composition of DNA and RNA from somatic tissues of humpback and its changes during spawning]. *Biokhimiia (Moscow, Russia)*, *32*(5), 988–993.
- Bjornsson, H. T., Sigurdsson, M. I., Fallin, M. D., Irizarry, R. A., Aspelund, T., Cui, H., Yu, W., Rongione, M. A., Ekström, T. J., Harris, T. B., Launer, L. J., Eiriksdottir, G., Leppert, M. F., Sapienza, C., Gudnason, V., & Feinberg, A. P. (2008). Intra-individual Change Over Time in DNA Methylation With Familial Clustering. *JAMA*, *299*(24), 2877–2883. <https://doi.org/10.1001/jama.299.24.2877>
- Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, M. E., Sánchez, F. J., Sinsheimer, J. S., Horvath, S., & Vilain, E. (2011). Epigenetic Predictor of Age. *PLOS ONE*, *6*(6), e14821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014821>
- Borský, P., Holmannová, D., Borská, L., Fiala, Z., Hruška, L., Esterková, M., Párová, H., Singh, A., Počtová, G., & Kučera, O. (2023). *Biomarkery stárnutí – aktuální stav poznání. 2023*.
- Boss, G. R., & Seegmiller, J. E. (1981). Age-Related Physiological Changes and Their Clinical Significance. *Western Journal of Medicine*, *135*(6), 434–440.
- Burianová, A. (2022). *Příprava proteinu pro TET-assisted pyridine borane sequencing [Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta]*. <https://theses.cz/id/9pa4wv/>

- Carpenter, M. A., Li, M., Rathore, A., Lackey, L., Law, E. K., Land, A. M., Leonard, B., Shandilya, S. M. D., Bohn, M.-F., Schiffer, C. A., Brown, W. L., & Harris, R. S. (2012). Methylcytosine and normal cytosine deamination by the foreign DNA restriction enzyme APOBEC3A. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(41), 34801–34808. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.385161>
- Clark, T. A., Lu, X., Luong, K., Dai, Q., Boitano, M., Turner, S. W., He, C., & Korlach, J. (2013). Enhanced 5-methylcytosine detection in single-molecule, real-time sequencing via Tet1 oxidation. *BMC Biology*, 11, 4. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-4>
- Compere, S. J., & Palmiter, R. D. (1981). DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene lymphoid cells. *Cell*, 25(1), 233–240. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90248-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90248-8)
- Correia Dias, H., Cordeiro, C., Corte Real, F., Cunha, E., & Manco, L. (2020). Age Estimation Based on DNA Methylation Using Blood Samples From Deceased Individuals. *Journal of Forensic Sciences*, 65(2), 465–470. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14185>
- Cowell, P. E., Turetsky, B. I., Gur, R. C., Grossman, R. I., Shtasel, D. L., & Gur, R. E. (1994). Sex differences in aging of the human frontal and temporal lobes. *Journal of Neuroscience*, 14(8), 4748–4755. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-08-04748.1994>
- Cross, S. H., Charlton, J. A., Nan, X., & Bird, A. P. (1994). Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column. *Nature Genetics*, 6(3), 236–244. <https://doi.org/10.1038/ng0394-236>
- Curradi, M., Izzo, A., Badaracco, G., & Landsberger, N. (2002). Molecular Mechanisms of Gene Silencing Mediated by DNA Methylation. *Molecular and Cellular Biology*, 22(9), 3157. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.9.3157-3173.2002>
- Doerfler, W. (1981). DNA methylation—A regulatory signal in eukaryotic gene expression. *The Journal of General Virology*, 57(Pt 1), 1–20. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-57-1-1>
- Duan, R., Fu, Q., Sun, Y., & Li, Q. (2022). Epigenetic clock: A promising biomarker and practical tool in aging. *Ageing Research Reviews*, 81, 101743. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101743>
- Flusberg, B. A., Webster, D., Lee, J., Travers, K., Olivares, E., Clark, T. A., Korlach, J., & Turner, S. W. (2010). Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nature methods*, 7(6), 461–465. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1459>
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L., & Paul, C. L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(5), 1827–1831. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1827>
- Gama-Sosa, M., Midgett, R., Slagel, V., Githens, S., Kuo, K., Gehrke, C., & Ehrlich, M. (1983). Tissue-specific differences in DNA methylation in various mammals. *Biochimica et biophysica acta*, 740, 212–219. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(83\)90079-9](https://doi.org/10.1016/0167-4781(83)90079-9)
- Gibney, E. R., & Nolan, C. M. (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.54>
- Gouil, Q., & Keniry, A. (2019). Latest techniques to study DNA methylation. *Essays in Biochemistry*, 63(6), 639–648. <https://doi.org/10.1042/EBC20190027>
- Grunau, C., Clark, S. J., & Rosenthal, A. (2001). Bisulfite genomic sequencing: Systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Research*, 29(13), e65. <https://doi.org/10.1093/nar/29.13.e65>
- Halušková, J. (2009). *Review Article Epigenetic Studies in Human Diseases*. 56.
- Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J.-B., Gao, Y., Deconde, R., Chen, M., Rajapakse, I., Friend, S., Ideker, T., & Zhang, K. (2013). Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Molecular Cell*, 49(2), 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.016>
- Harley, C. B., Futcher, A. B., & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274), Article 6274. <https://doi.org/10.1038/345458a0>

- Hashimoto, H., Pais, J. E., Zhang, X., Saleh, L., Fu, Z.-Q., Dai, N., Corrêa, I. R., Zheng, Y., & Cheng, X. (2014). Structure of a Naegleria Tet-like dioxygenase in complex with 5-methylcytosine DNA. *Nature*, *506*(7488), 391–395. <https://doi.org/10.1038/nature12905>
- He, Y.-F., Li, B.-Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., Sun, Y., Li, X., Dai, Q., Song, C.-X., Zhang, K., He, C., & Xu, G.-L. (2011). Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA. *Science*, *333*(6047), 1303–1307. <https://doi.org/10.1126/science.1210944>
- Hernandez, D. G., Nalls, M. A., Gibbs, J. R., Arepalli, S., van der Brug, M., Chong, S., Moore, M., Longo, D. L., Cookson, M. R., Traynor, B. J., & Singleton, A. B. (2011). Distinct DNA methylation changes highly correlated with chronological age in the human brain. *Human Molecular Genetics*, *20*(6), 1164–1172. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq561>
- Holliday, R., & Pugh, J. E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science (New York, N.Y.)*, *187*(4173), 226–232.
- Hong, S. R., & Shin, K.-J. (2021). Bisulfite-Converted DNA Quantity Evaluation: A Multiplex Quantitative Real-Time PCR System for Evaluation of Bisulfite Conversion. *Frontiers in Genetics*, *12*. <https://www.frontiersin.org/journals/genetics/articles/10.3389/fgene.2021.618955>
- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology*, *14*(10), 3156. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
- Horvath, S., & Raj, K. (2018). DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nature Reviews Genetics*, *19*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0004-3>
- Hotchkiss, R. D. (1948). The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*, *175*(1), 315–332.
- Hsu, H.-K., Weng, Y.-I., Hsu, P.-Y., Huang, T. H.-M., & Huang, Y.-W. (2020). Detection of DNA Methylation by MeDIP and MBDCap Assays: An Overview of Techniques. In P. Keohavong, K. P. Singh, & W. Gao (Ed.), *Molecular Toxicology Protocols* (s. 225–234). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0223-2_12
- Hsu, Y.-W., Huang, R.-L., & Lai, H.-C. (2015). MeDIP-on-Chip for Methylation Profiling. In D. Keppler & A. W. Lin (Ed.), *Cervical Cancer: Methods and Protocols* (s. 281–290). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2013-6_21
- Hu, L., Li, Z., Cheng, J., Rao, Q., Gong, W., Liu, M., Shi, Y. G., Zhu, J., Wang, P., & Xu, Y. (2013). Crystal structure of TET2-DNA complex: Insight into TET-mediated 5mC oxidation. *Cell*, *155*(7), 1545–1555. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.020>
- Cheng, J., Siejka-Zielińska, P., Liu, Y., Chandran, A., Kriaucionis, S., & Song, C.-X. (2021). Endonuclease enrichment TAPS for cost-effective genome-wide base-resolution DNA methylation detection. *Nucleic Acids Research*, *49*(13), e76. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab291>
- Cheng, Y., Bernstein, A., Chen, D., & Jin, P. (2015). 5-Hydroxymethylcytosine: A new player in brain disorders? *Experimental Neurology*, *268*, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.05.008>
- Cheung, H.-H., Lee, T.-L., Rennert, O. M., & Chan, W.-Y. (2012). Methylation Profiling Using Methylated DNA Immunoprecipitation and Tiling Array Hybridization. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *825*, 115–126. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-436-0_10
- Cho, S., Jung, S.-E., Hong, S. R., Lee, E. H., Lee, J. H., Lee, S. D., & Lee, H. Y. (2017). Independent validation of DNA-based approaches for age prediction in blood. *Forensic Science International: Genetics*, *29*, 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.04.020>
- Christensen, B. C., Houseman, E. A., Marsit, C. J., Zheng, S., Wrensch, M. R., Wiemels, J. L., Nelson, H. H., Karagas, M. R., Padbury, J. F., Bueno, R., Sugarbaker, D. J., Yeh, R.-F., Wiencke, J. K., & Kelsey, K. T. (2009). Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genetics*, *5*(8), e1000602. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000602>

- Illingworth, R., Kerr, A., Desousa, D., Jørgensen, H., Ellis, P., Stalker, J., Jackson, D., Clee, C., Plumb, R., Rogers, J., Humphray, S., Cox, T., Langford, C., & Bird, A. (2008). A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biology*, *6*(1), e22. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060022>
- Ito, S., D'Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C., & Zhang, Y. (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES cell self-renewal, and ICM specification. *Nature*, *466*(7310), 1129–1133. <https://doi.org/10.1038/nature09303>
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., He, C., & Zhang, Y. (2011). Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science*, *333*(6047), 1300–1303. <https://doi.org/10.1126/science.1210597>
- Jacinto, F. V., Ballestar, E., & Esteller, M. (2008). Methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP): Hunting down the DNA methylome. *BioTechniques*, *44*(1), 35, 37, 39 passim. <https://doi.org/10.2144/000112708>
- Jin, B., & Robertson, K. D. (2013). DNA Methyltransferases, DNA Damage Repair, and Cancer. In A. R. Karpf (Ed.), *Epigenetic Alterations in Oncogenesis* (s. 3–29). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9967-2_1
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews. Genetics*, *13*(7), 484–492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
- Jylhävä, J., Pedersen, N. L., & Hägg, S. (2017). Biological Age Predictors. *eBioMedicine*, *21*, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.046>
- Kareta, M. S., Botello, Z. M., Ennis, J. J., Chou, C., & Chédin, F. (2006). Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(36), 25893–25902. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603140200>
- Karlsson, A. O., Svensson, A., Marklund, A., & Holmlund, G. (2008). Estimating human age in forensic samples by analysis of telomere repeats. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, *1*(1), 569–571. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2007.10.153>
- Khare, T., Pai, S., Koncivicius, K., Pal, M., Kriukiene, E., Liutkeviciute, Z., Irimia, M., Jia, P., Ptak, C., Xia, M., Tice, R., Tochigi, M., Moréra, S., Nazarians, A., Belsham, D., Wong, A. H. C., Blencowe, B. J., Wang, S. C., Kapranov, P., ... Petronis, A. (2012). 5-hmC in the brain is abundant in synaptic genes and shows differences at the exon-intron boundary. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2372>
- Kim, J. K., Samaranyake, M., & Pradhan, S. (2008). Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *66*(4), 596. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8432-4>
- Kirkwood, T. B. L. (2005). Understanding the Odd Science of Aging. *Cell*, *120*(4), 437–447. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.027>
- Kotková, L., & Drábek, J. (2023). Age-related changes in sperm DNA methylation and their forensic and clinical implications. *Epigenomics*, *15*(21), 1157–1173. <https://doi.org/10.2217/epi-2023-0307>
- Kresse, S. H., Brandt-Winge, S., Pharo, H., Flatin, B. T. B., Jeanmougin, M., Vedeld, H. M., & Lind, G. E. (2023). Evaluation of commercial kits for isolation and bisulfite conversion of circulating cell-free tumor DNA from blood. *Clinical Epigenetics*, *15*(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s13148-023-01563-0>
- Kriaucionis, S., & Heintz, N. (2009). The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain. *Science*, *324*(5929), 929–930. <https://doi.org/10.1126/science.1169786>
- Lee, H. Y., Jung, S.-E., Oh, Y. N., Choi, A., Yang, W. I., & Shin, K.-J. (2015). Epigenetic age signatures in the forensically relevant body fluid of semen: A preliminary study. *Forensic Science International: Genetics*, *19*, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.014>
- Lee, H. Y., Lee, S. D., & Shin, K.-J. (2016). Forensic DNA methylation profiling from evidence material for investigative leads. *BMB Reports*, *49*(7), 359–369. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.7.070>

- Lee, J. W., Choung, C. M., Jung, J. Y., Lee, H. Y., & Lim, S.-K. (2018). A validation study of DNA methylation-based age prediction using semen in forensic casework samples. *Legal Medicine*, *31*, 74–77. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2018.01.005>
- Li, D., Zhang, B., Xing, X., & Wang, T. (2015). Combining MeDIP-seq and MRE-seq to investigate genome-wide CpG methylation. *Methods (San Diego, Calif.)*, *72*, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.10.032>
- Li, J., Li, L., Wang, Y., Huang, G., Li, X., Xie, Z., & Zhou, Z. (2021). Insights Into the Role of DNA Methylation in Immune Cell Development and Autoimmune Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 757318. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.757318>
- Li, Y., & Tollefsbol, T. O. (2011). DNA methylation detection: Bisulfite genomic sequencing analysis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *791*, 11–21. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-316-5_2
- Liang, P., Song, F., Ghosh, S., Morien, E., Qin, M., Mahmood, S., Fujiwara, K., Igarashi, J., Nagase, H., & Held, W. A. (2011). Genome-wide survey reveals dynamic widespread tissue-specific changes in DNA methylation during development. *BMC Genomics*, *12*(1), 231. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-231>
- Liu, Y., Rosikiewicz, W., Pan, Z., Jillette, N., Wang, P., Taghbalout, A., Foox, J., Mason, C., Carroll, M., Cheng, A., & Li, S. (2021). DNA methylation-calling tools for Oxford Nanopore sequencing: A survey and human epigenome-wide evaluation. *Genome Biology*, *22*(1), 295. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02510-z>
- Liu, Y., Siejka-Zielińska, P., Velikova, G., Bi, Y., Yuan, F., Tomkova, M., Bai, C., Chen, L., Schuster-Böckler, B., & Song, C.-X. (2019). Bisulfite-free direct detection of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at base resolution. *Nature Biotechnology*, *37*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0041-2>
- Liu, Y., & Song, C.-X. (2022). TAPS: The Development of a Direct and Base-Resolution Sequencing Method for DNA Methylation. *ACS Chemical Biology*, *17*(10), 2683–2685. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.2c00746>
- Meyer, T. D., Mampaey, E., Vlemmix, M., Denil, S., Trooskens, G., Renard, J.-P., Keulenaer, S. D., Dehan, P., Menschaert, G., & Criekinge, W. V. (2013). Quality Evaluation of Methyl Binding Domain Based Kits for Enrichment DNA-Methylation Sequencing. *PLOS ONE*, *8*(3), e59068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059068>
- Miller, R. H., Pollard, C. A., Brogaard, K. R., Olson, A. C., Barney, R. C., Lipshultz, L. I., Johnstone, E. B., Ibrahim, Y. O., Hotaling, J. M., Schisterman, E. F., Mumford, S. L., Aston, K. I., & Jenkins, T. G. (2023). Tissue-specific DNA methylation variability and its potential clinical value. *Frontiers in Genetics*, *14*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2023.1125967>
- Miranda, T. B., & Jones, P. A. (2007). DNA methylation: The nuts and bolts of repression. *Journal of Cellular Physiology*, *213*(2), 384–390. <https://doi.org/10.1002/jcp.21224>
- Mohn, F., Weber, M., Schübeler, D., & Roloff, T.-C. (2009). Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *507*, 55–64. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-522-0_5
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, *38*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- Moqri, M., Herzog, C., Poganik, J. R., Justice, J., Belsky, D. W., Higgins-Chen, A., Moskalev, A., Fuellen, G., Cohen, A. A., Bautmans, I., Widschwendter, M., Ding, J., Fleming, A., Mannick, J., Han, J.-D. J., Zhavoronkov, A., Barzilai, N., Kaeberlein, M., Cummings, S., ... Gladyshev, V. N. (2023). Biomarkers of aging for the identification and evaluation of longevity interventions. *Cell*, *186*(18), 3758–3775. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.08.003>
- Morrison, J., Koeman, J. M., Johnson, B. K., Foy, K. K., Beddows, I., Zhou, W., Chesla, D. W., Rossell, L. L., Siegwald, E. J., Adams, M., & Shen, H. (2021). Evaluation of whole-genome DNA methylation sequencing library preparation protocols. *Epigenetics & Chromatin*, *14*(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13072-021-00401-y>

- Nafee, T. M., Farrell, W. E., Carroll, W. D., Fryer, A. A., & Ismail, K. M. K. (2008). Epigenetic control of fetal gene expression. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *115*(2), 158–168. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2007.01528.x>
- Nair, S. S., Coolen, M. W., Stirzaker, C., Song, J. Z., Statham, A. L., Strbenac, D., Robinson, M. D., & Clark, S. J. (2011). Comparison of methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP) and methyl-CpG binding domain (MBD) protein capture for genome-wide DNA methylation analysis reveal CpG sequence coverage bias. *Epigenetics*, *6*(1), 34–44. <https://doi.org/10.4161/epi.6.1.13313>
- Olivetti, G., Giordano, G., Corradi, D., Melissari, M., Lagrasta, C., Gambert, S. R., & Anversa, P. (1995). Gender differences and aging: Effects on the human heart. *Journal of the American College of Cardiology*, *26*(4), 1068–1079. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(95\)00282-8](https://doi.org/10.1016/0735-1097(95)00282-8)
- Olova, N., Krueger, F., Andrews, S., Oxley, D., Berrens, R. V., Branco, M. R., & Reik, W. (2018). Comparison of whole-genome bisulfite sequencing library preparation strategies identifies sources of biases affecting DNA methylation data. *Genome Biology*, *19*, 33. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1408-2>
- Pajares, M. J., Palanca-Ballester, C., Urtasun, R., Alemany-Cosme, E., Lahoz, A., & Sandoval, J. (2021). Methods for analysis of specific DNA methylation status. *Methods*, *187*, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.06.021>
- Pan, Z., Zhang, M., Ma, T., Xue, Z.-Y., Li, G.-F., Hao, L.-Y., Zhu, L.-J., Li, Y.-Q., Ding, H.-L., & Cao, J.-L. (2016). Hydroxymethylation of microRNA-365-3p Regulates Nociceptive Behaviors via Kcnh2. *The Journal of Neuroscience*, *36*(9), 2769–2781. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3474-15.2016>
- Pisarek, A., Pośpiech, E., Heidegger, A., Xavier, C., Papież, A., Piniewska-Róg, D., Kalamara, V., Potabattula, R., Bochenek, M., Sikora-Polaczek, M., Macur, A., Woźniak, A., Janeczko, J., Phillips, C., Haaf, T., Polań, J., ska, Parson, W., Kayser, M., & Branicki, W. (2021). Epigenetic age prediction in semen – marker selection and model development. *Aging*, *13*(15), 19145–19164. <https://doi.org/10.18632/aging.203399>
- Rana, A. K. (2018). Crime investigation through DNA methylation analysis: Methods and applications in forensics. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, *8*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s41935-018-0042-1>
- Rasmi, Y., Shokati, A., Hassan, A., Aziz, S. G.-G., Bastani, S., Jalali, L., Moradi, F., & Alipour, S. (2022). The role of DNA methylation in progression of neurological disorders and neurodegenerative diseases as well as the prospect of using DNA methylation inhibitors as therapeutic agents for such disorders. *IBRO Neuroscience Reports*, *14*, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.12.002>
- Ratel, D., Ravanat, J.-L., Berger, F., & Wion, D. (2006). N6-methyladenine: The other methylated base of DNA. *Bioessays*, *28*(3), 309–315. <https://doi.org/10.1002/bies.20342>
- Rauluseviciute, I., Drabløs, F., & Rye, M. B. (2019). DNA methylation data by sequencing: Experimental approaches and recommendations for tools and pipelines for data analysis. *Clinical Epigenetics*, *11*(1), 193. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0795-x>
- Rivero-Segura, N. A., Bello-Chavolla, O. Y., Barrera-Vázquez, O. S., Gutierrez-Robledo, L. M., & Gomez-Verjan, J. C. (2020). Promising biomarkers of human aging: In search of a multi-omics panel to understand the aging process from a multidimensional perspective. *Ageing Research Reviews*, *64*, 101164. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101164>
- Ruike, Y., Imanaka, Y., Sato, F., Shimizu, K., & Tsujimoto, G. (2010). Genome-wide analysis of aberrant methylation in human breast cancer cells using methyl-DNA immunoprecipitation combined with high-throughput sequencing. *BMC Genomics*, *11*, 137. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-137>
- Serre, D., Lee, B. H., & Ting, A. H. (2010). MBD-isolated Genome Sequencing provides a high-throughput and comprehensive survey of DNA methylation in the human genome. *Nucleic Acids Research*, *38*(2), 391–399. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp992>
- Shay, J. W. (2018). Telomeres and aging. *Current Opinion in Cell Biology*, *52*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.12.001>

- Siejka-Zielińska, P., Cheng, J., Jackson, F., Liu, Y., Soonawalla, Z., Reddy, S., Silva, M., Puta, L., McCain, M. V., Culver, E. L., Bekkali, N., Schuster-Böckler, B., Palamara, P. F., Mann, D., Reeves, H., Barnes, E., Sivakumar, S., & Song, C.-X. (2021). Cell-free DNA TAPS provides multimodal information for early cancer detection. *Science Advances*, 7(36), eabh0534. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abh0534>
- Silvas, T. V., Hou, S., Myint, W., Nalivaika, E., Somasundaran, M., Kelch, B. A., Matsuo, H., Kurt Yilmaz, N., & Schiffer, C. A. (2018). Substrate sequence selectivity of APOBEC3A implicates intra-DNA interactions. *Scientific Reports*, 8, 7511. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25881-z>
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next Generation Sequencing Technologies. *Current protocols in molecular biology*, 122(1), e59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
- Stoudt, H. W. (1981). The Anthropometry of the Elderly. *Human Factors*, 23(1), 29–37. <https://doi.org/10.1177/001872088102300104>
- Surace, A. E. A., & Hedrich, C. M. (2019). The Role of Epigenetics in Autoimmune/Inflammatory Disease. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01525>
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., & Rao, A. (2009). Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science*, 324(5929), 930–935. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>
- Tamanaha, E., Guan, S., Marks, K., & Saleh, L. (2016). Distributive Processing by the Iron(II)/ α -Ketoglutarate-Dependent Catalytic Domains of the TET Enzymes Is Consistent with Epigenetic Roles for Oxidized 5-Methylcytosine Bases. *Journal of the American Chemical Society*, 138(30), 9345–9348. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b03243>
- Tan, L., & Shi, Y. G. (2012). Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease. *Development (Cambridge, England)*, 139(11), 1895–1902. <https://doi.org/10.1242/dev.070771>
- Tanaka, K., & Okamoto, A. (2007). Degradation of DNA by bisulfite treatment. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(7), 1912–1915. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.01.040>
- Teschendorff, A. E., Menon, U., Gentry-Maharaj, A., Ramus, S. J., Weisenberger, D. J., Shen, H., Campan, M., Noushmehr, H., Bell, C. G., Maxwell, A. P., Savage, D. A., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Kocjan, G., Gayther, S. A., Jones, A., Beck, S., Wagner, W., Laird, P. W., ... Widschwendter, M. (2010). Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer. *Genome Research*, 20(4), 440–446. <https://doi.org/10.1101/gr.103606.109>
- Thong, Z., Chan, X. L. S., Tan, J. Y. Y., Loo, E. S., & Syn, C. K. C. (2017). Evaluation of DNA methylation-based age prediction on blood. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 6, e249–e251. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2017.09.095>
- Tse, O. Y. O., Jiang, P., Cheng, S. H., Peng, W., Shang, H., Wong, J., Chan, S. L., Poon, L. C. Y., Leung, T. Y., Chan, K. C. A., Chiu, R. W. K., & Lo, Y. M. D. (2021). Genome-wide detection of cytosine methylation by single molecule real-time sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(5), e2019768118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2019768118>
- Unnikrishnan, A., Freeman, W. M., Jackson, J., Wren, J. D., Porter, H., & Richardson, A. (2019). The role of DNA methylation in epigenetics of aging. *Pharmacology & Therapeutics*, 195, 172–185. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.11.001>
- Unnikrishnan, A., Hadad, N., Masser, D. R., Jackson, J., Freeman, W. M., & Richardson, A. (2018). Revisiting the genomic hypomethylation hypothesis of aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1418(1), 69–79. <https://doi.org/10.1111/nyas.13533>
- Vaisvila, R., Ponnaluri, V. K. C., Sun, Z., Langhorst, B. W., Saleh, L., Guan, S., Dai, N., Campbell, M. A., Sexton, B. S., Marks, K., Samaranayake, M., Samuelson, J. C., Church, H. E., Tamanaha, E., Corrêa, I. R., Pradhan, S., Dimalanta, E. T., Evans, T. C., Williams, L., & Davis, T. B. (2021). Enzymatic methyl sequencing detects DNA methylation at

- single-base resolution from picograms of DNA. *Genome Research*, 31(7), 1280–1289. <https://doi.org/10.1101/gr.266551.120>
- Veland, N., Lu, Y., Hardikar, S., Gaddis, S., Zeng, Y., Liu, B., Estecio, M. R., Takata, Y., Lin, K., Tomida, M. W., Shen, J., Saha, D., Gowher, H., Zhao, H., & Chen, T. (2019). DNMT3L facilitates DNA methylation partly by maintaining DNMT3A stability in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research*, 47(1), 152–167. <https://doi.org/10.1093/nar/gky947>
- Wagner, K.-H., Cameron-Smith, D., Wessner, B., & Franzke, B. (2016). Biomarkers of Aging: From Function to Molecular Biology. *Nutrients*, 8(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/nu8060338>
- Weber, M., Davies, J. J., Wittig, D., Oakeley, E. J., Haase, M., Lam, W. L., & Schübeler, D. (2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature Genetics*, 37(8), 853–862. <https://doi.org/10.1038/ng1598>
- Weber, M., & Schübeler, D. (2007). Weber M, Schübeler D. Genomic patterns of DNA methylation: Targets and function of an epigenetic mark. *Curr Opin Cell Biol* 19: 273–280. *Current opinion in cell biology*, 19, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.04.011>
- Weidner, C. I., Lin, Q., Koch, C. M., Eisele, L., Beier, F., Ziegler, P., Bauerschlag, D. O., Jöckel, K.-H., Erbel, R., Mühleisen, T. W., Zenke, M., Brümmendorf, T. H., & Wagner, W. (2014). Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biology*, 15(2), R24. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r24>
- Weng, Y.-I., Huang, T. H.-M., & Yan, P. S. (2009). Methylated DNA immunoprecipitation and microarray-based analysis: Detection of DNA methylation in breast cancer cell lines. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 590, 165–176. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-378-7_10
- Whittemore, K., Martínez-Nevaldo, E., & Blasco, M. A. (2019). Slower rates of accumulation of DNA damage in leukocytes correlate with longer lifespans across several species of birds and mammals. *Aging (Albany NY)*, 11(21), 9829–9845. <https://doi.org/10.18632/aging.102430>
- Wijesinghe, P., & Bhagwat, A. S. (2012). Efficient deamination of 5-methylcytosines in DNA by human APOBEC3A, but not by AID or APOBEC3G. *Nucleic Acids Research*, 40(18), 9206–9217. <https://doi.org/10.1093/nar/gks685>
- Wilson, V. L., Smith, R. A., Ma, S., & Cutler, R. G. (1987). Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(21), 9948–9951.
- Xiao, C.-L., Zhu, S., He, M., Chen, D., Zhang, Q., Chen, Y., Yu, G., Liu, J., Xie, S.-Q., Luo, F., Liang, Z., Wang, D.-P., Bo, X.-C., Gu, X.-F., Wang, K., & Yan, G.-R. (2018). N6-Methyladenine DNA Modification in the Human Genome. *Molecular Cell*, 71(2), 306–318.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.015>
- Younesian, S., Yousefi, A.-M., Momeny, M., Ghaffari, S. H., & Bashash, D. (2022). The DNA Methylation in Neurological Diseases. *Cells*, 11(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/cells11213439>
- Zbieć-Piekarska, R., Spólnicka, M., Kupiec, T., Parys-Proszek, A., Makowska, Ż., Paleczka, A., Kucharczyk, K., Płoski, R., & Branicki, W. (2015). Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 17, 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.001>
- Zhang, H., Zhang, X., Clark, E., Mulcahey, M., Huang, S., & Shi, Y. G. (2010). TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. *Cell Research*, 20(12), 1390–1393. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.156>

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

5caC	5-karboxycytosin
5hmC	5-hydroxymetylcytosin
5mC	5-metylcytosin
5fC	5-formylcytosin
5gmc	5-(p-glukosyloxymethyl)cytosin
APOBEC3a	apolipoprotein B mRNA upravující katalytickou podjednotku 3A
BisQuE	kvantitativní evaluace bisulfitově konvertované DNA
CAPS	chemicky asistovaná modifikace
cfTAPS	TET-asistované pyridin boranové sekvenování pro cirkulující volnou DNA
CpG	cytosin-fosfát-guanin
DHU	dihydrouracil
DNMT	DNA-metyltransferasa
DS-DMRs	vývojově specifické regiony
DSBH	beta-helix dvoušroubovice
eeTAPS	endonukleasové obohacení TET-asistovaného pyridin boranového sekvenování
EM-seq	enzymatické metylové sekvenování
fC	formylcytosin
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HUGO	Human Genome Organisation
IPC	interní pozitivní kontrola
m ⁶ A	N ⁶ -methyladenin
m ⁴ C	N ⁴ -metylcytosin
MBD-capture	zachycení pomocí metyl-CpG vazebné domény
MeDIP	imunoprecipitace metylované DNA
MSP	metylačně specifická PCR
MRE-Seq	sekvenování se štěpením restrikcními enzymy citlivými na metylaci
NGS	sekvenování nové generace
PCR	polymerasová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
SAM	S-adenosyl-L-metionin
SMRT	jednomolekulové sekvenování v reálném čase
STR	krátké tandemové repetice
T4-βGT	T4-fág beta glukosyltransferasa
TAPS	TET-asistované pyridin boranové sekvenování
TDG	tymin-DNA-glykosylasa
T-DMRs	tkáňově specificky diferenciólně metylované regiony
TET	ten-eleven translokační enzymy
ÚMTM	Ústav molekulární a translační medicíny
WGBS	celogenomové bisulfitové sekvenování

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1 Schéma *de novo* metylace za účasti DNMT3A a DNMT3B. Metylová skupina je přenesena z S-adenosyl-L-metioninu na nukleotidové vlákno.
- Obrázek 2 Souhrnné schéma procesu *de novo* metylace za účasti DNMT3A a DNMT3B, uchování metylačního vzoru za účasti enzymu DNMT1, pasivní demethylace 5-metylcytosinu na cytosin a aktivní demethylace za účasti enzymů TET a tymin-DNA-glykosylasy (TDG).
- Obrázek 3 Modifikace DNA za účasti bisulfitu sodného. Během bisulfitové konverze dochází k přeměně nemetylovaného cytosinu na uracil, zatímco cytosin s navázanou metylovou skupinou zůstává nezměněn. Následuje PCR, při níž je metylovaný cytosin propagován jako cytosin a uracil jako tymin.
- Obrázek 4 Schéma enzymatické konverze. Působením TET2 dochází k přeměně 5-metylcytosinu na meziprodukty, jež nemohou být deaminovány APOBEC. Tento proces umožňuje odlišení v sekvenční fázi, kde se prvně metylované cytosiny ukazují jako cytosiny, zatímco nemetylované cytosiny jsou sekvenovány jako tymin.
- Obrázek 5 Schéma průběhu TAPS reakce. Prvním krokem je enzymatická reakce TET1 s modifikovanými cytosiny za vzniku 5-karboxycytosinu. 5-karboxycytosin je poté pyridin boranem přeměněn na dihydrouracil, který je v průběhu PCR transformován na tymin. Nemodifikované cytosiny zůstávají nezměněny.
- Obrázek 6 Ukázka standardů u experimentů č. 11 (výše) a 12 (níže) s podmínkami touchdown 70 °C–60 °C. Ve sloupcích Ct1 a Ct2 (duplikáty) je možné pozorovat až už nesmyslné, či chybějící hodnoty pro standardy.
- Obrázek 7 Ukázka standardů (výše) a C- T- indikátorů (níže) u experimentu č. 14. Standardy jsou v pořádku, avšak hodnoty Ct1 a Ct2 (duplikáty) u C-indikátoru vykazují křivku ve tvaru U.
- Obrázek 8 Ukázka standardů (výše) a C- T- indikátorů (níže) u experimentu č. 17. Ct hodnoty u standardů i indikátorů jsou v pořádku.
- Obrázek 9 Ukázka standardů (výše) a C- T- indikátorů (níže) u experimentu pro evaluaci konverze vzorků po NEBNext a bisulfitové konverzi. Standardy i indikátory byly měřeny v duplikátech (Ct1 a Ct2). Ct hodnoty u standardů i indikátorů jsou v pořádku.
- Obrázek 10 Vzorce pro vyhodnocení úspěšnosti konverze, úrovně degradace a návratnosti. Převzato z Hong & Shin, 2021
- Obrázek 11 Ukázka standardů (výše) a C- T- indikátorů (níže) u experimentu pro evaluaci konverze vzorků po bisulfitové konverzi s rozdílnými amplifikačními přístupy. Standardy i indikátory byly měřeny v duplikátech (Ct1 a Ct2). Ct hodnoty u standardů i indikátorů jsou v pořádku.

10 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1	Epigenetické hodiny pro určení věku (Unnikrishnan <i>et al.</i> , 2019)
Tabulka 2	Vzorky periferní krve českých dárců
Tabulka 3	Reakční mix pro přípravu metylovaného standardu
Tabulka 4	Nastavení termocykléru pro přípravu nemetylovaného standardu (příprava knihovny)
Tabulka 5	Amplifikační mastermix pipetovaný ke vzorkům po přípravě knihovny
Tabulka 6	Nastavení termocykléru pro přípravu nemetylovaného standardu (amplifikace)
Tabulka 7	Reagencie pro kvantifikaci DNA
Tabulka 8	Reagencie pro metyl-specifickou PCR
Tabulka 9	Nastavení real-time cykléru pro metyl-specifickou PCR
Tabulka 10	Nastavení termocykléru pro bisulfitovou konverzi
Tabulka 11	Nastavení termocykléru pro bisulfitovou konverzi – alternativa 1
Tabulka 12	Nastavení termocykléru pro bisulfitovou konverzi – alternativa 2
Tabulka 13	Nastavení programu pro fragmentaci DNA
Tabulka 14	Reagencie pro oxidaci 5-metylcytosinů a 5-hydroxymetylcytosinů
Tabulka 15	Reagencie pro deaminaci cytosinů
Tabulka 16	Příprava primerových mixů
Tabulka 17	Reagencie pro qPCR reakci
Tabulka 18	Nastavení termocykléru pro qPCR
Tabulka 19	Program pro tagmentaci
Tabulka 20	Program pro indexační PCR
Tabulka 21	Nastavení workflow parametrů v programu Illumina Experiment Manager
Tabulka 22	Hodnoty pro vytvoření BED souboru (koordináty jsou uvedeny pro genom hg19)
Tabulka 23	Nastavení parametrů pro import vzorků
Tabulka 24	Nastavení parametrů pro import anotace
Tabulka 25	Nastavení parametrů pro kvantifikační report
Tabulka 26	Nastavení parametrů pro kvantitativní PCR (BisQuE)
Tabulka 27	Porovnání metylovaných a nemetylovaných standardů, bisulfitová konverze
Tabulka 28	Porovnání metylovaných a nemetylovaných standardů, NEBNext
Tabulka 29	Výsledky navýšení množství enzymu na 12 a 24 IU
Tabulka 30	Výsledky sekvenování po bisulfitové konverzi – pokrytí lokusů; NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard
Tabulka 31	Výsledky sekvenování po bisulfitové konverzi – metylace cytosinu a stanovení věku; NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard
Tabulka 32	Výsledky sekvenování po bisulfitové konverzi – pokrytí lokusů; NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard
Tabulka 33	Výsledky sekvenování po bisulfitové konverzi – metylace cytosinu a stanovení věku; NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard
Tabulka 34	Výsledky sekvenování po NEBNext – pokrytí lokusů; NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard
Tabulka 35	Výsledky sekvenování po NEBNext – metylace cytosinu a stanovení věku; NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard
Tabulka 36	Výsledky sekvenování po NEBNext – pokrytí lokusů; NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard

- Tabulka 37 Výsledky sekvenování po NEBNext – metylace cytosinu a stanovení věku; NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard
- Tabulka 38 Výsledky sekvenování po NEBNext – pokrytí lokusů; Ref – referenční vzorek, NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard, F - formamid
- Tabulka 39 Výsledky sekvenování po NEBNext – metylace cytosinu a stanovení věku; Ref – referenční vzorek, NS – nemetylovaný standard, MS – metylovaný standard, F – formamid
- Tabulka 40 BisQuE: Ct hodnoty a odpovídající množství pro vzorky po bisulfitové konverzi; MS – metylovaný standard, NS – nemetylovaný standard, vzorek 1-5 – pacientské vzorky.
- Tabulka 41 BisQuE: Účinnost konverze, degradace a návratnost pro vzorky po bisulfitové konverzi; MS – metylovaný standard, NS – nemetylovaný standard, vzorek 1-5 – pacientské vzorky.
- Tabulka 42 BisQuE: Ct hodnoty a odpovídající množství pro pacientské vzorky a standardy ze 7. 11. 2023 po NEBNext; MS – metylovaný standard, NS – nemetylovaný standard, vzorek 1-5 – pacientské vzorky.
- Tabulka 43 BisQuE: Účinnost konverze, degradace a návratnost pro pacientské vzorky a standardy ze 7. 11. 2023 po NEBNext; MS – metylovaný standard, NS – nemetylovaný standard, vzorek 1-5 – pacientské vzorky.
- Tabulka 44 BisQuE: Ct hodnoty a odpovídající množství pro vzorky po NEBNext s různými přístupy denaturace; R1-2 – referenční vzorek (duplikáty), NS1-2 nemetylovaný standard (duplikáty), MS1-2 metylovaný standard (duplikáty); F- formamid
- Tabulka 45 BisQuE: Účinnost konverze, degradace a návratnost pro vzorky po NEBNext s různými přístupy denaturace; R1-2 – referenční vzorek (duplikáty), NS1-2 nemetylovaný standard (duplikáty), MS1-2 metylovaný standard (duplikáty), F- formamid
- Tabulka 46 BisQuE: Ct hodnoty a množství pro referenční vzorek a standardy po aplikaci tří různých metod amplifikace při bisulfitové konverzi, čísla 1 a 2 označují dva alternativní přístupy; Ref – referenční vzorek, MS – metylovaný standard, NS – nemetylovaný standard
- Tabulka 47 BisQuE: Účinnost konverze, degradace a návratnost pro referenční vzorek a standardy po aplikaci tří různých metod amplifikace při bisulfitové konverzi, čísla 1 a 2 označují dva alternativní přístupy; Ref – referenční vzorek, MS – metylovaný standard, NS – nemetylovaný standard