

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2021

Bc. Eliška Haasová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Beta testování kitu PyroMark Q48 FX
Age Assay (QiaGen)

Diplomová práce

Bc. Eliška Haasová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Eliška HAASOVÁ
Osobní číslo: R190610
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Beta testování kitu PyroMark Q48 FX Age Assay (QiaGen)
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Epigenetika studuje dědičné změny fenotypu, které nezahrnují změny sekvence nukleotidů v DNA. Jedna z relativně jednoduše laboratorně zkoumatelných epigenetických charakteristik je methylace DNA. Methylační status vzorku se zjišťuje epigenotypováním, kdy se DNA po izolaci podrobí bisulfitační reakci a potom genotypizační reakci, což je nejčastěji pyrosekvenování nebo sekvenování. V kriminalistické praxi se epigenotypování dá použít pro autentizaci přírodní DNA, určení tkáně původu u biologického vzorku, určení denního/nočního času depozice vzorku nebo vzorce chování zůstavitele stopy (kuřáctví, alkoholismus, drogová závislost, socioekonomický status, režim fyzické aktivity, velikost BMI, vegetariánství) a také pro určení věku (1-3). Pro odhad věku ze stopy krve firma QiaGen dokonce už prodává epigenotypizační soupravu, vytvořenou na základě polského výzkumu (4-6). Tuto soupravu jsme vyzkoušeli na souboru 250 českých vzorků dárců krve. Místo očekávaného rozdílu kalendářní věk vs. epigenetický věk 72 roky jsme se setkali i s rozdílem 27 let. Takový rozsah chybovosti není přijatelný pro reálné použití metody v policii ČR, kde by mohla pomoci při zúžení populace podezřelých ve chvíli, kdy profil DNA z místa činu není nalezen v kriminalistické databázi. Například nalezení vraha Barbory Němečkové v Kmetiněvsi (2004) pomocí populačního profilování DNA všech mužů z okolí Kmetiněvse by bylo určitě rychlejší, kdyby se pomocí epigenotypování vědělo, že vrah je nezletilý. Na základě zpětné vazby z naší laboratoře a z dalších laboratoří firma QiaGen vyvinula novou verzi kitu: PyroMark Q48 FX Age Assay. Cílem diplomové práce je sepsat rešerši problematiky určování věku pomocí měření methylace DNA a provést část validace kitu PyroMark Q48 FX Age Assay podle rozpisu QiaGen a v rámci mezinárodní spolupráce.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

- (1) Kayser M. Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 18:33-48.
- (2) Vidaki A, Ballard D, Aliferi A, Miller TH, Barron LP, Syndercombe Court. DNA methylation-based forensic age prediction using artificial neural networks and next generation sequencing. *Forensic Sci Int Genet* 2017; 28:225-236.
- (3) Vidaki A, Kayser M. Recent progress, methods and perspectives in forensic epigenetics. *Forensic Sci Int Genet* 2018; 37:180-195.
- (4) Spolnicka M, Pospiech E, Peplonska B, Zbiac-Piekarska R, Makowska Z, Pieta A et al. DNA methylation in ELOVL2 and C1orf132 correctly predicted chronological age of individuals from three disease groups. *Int J Legal Med* 2018; 132(1):1-11.
- (5) Zbiac-Piekarska R, Spolnicka M, Kupiec T, Parys-Proszek A, Makowska Z, Paleczka A et al. Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 17:173-179.

(6) Zbiac-Piekarska R, Spolnicka M, Kupiec T, Makowska Z, Spas A, Parys-Proszek A et al. Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. Forensic Sci Int Genet 2015; 14:161-167.

Vedoucí diplomové práce: prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.
Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání diplomové práce: 12. října 2019
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2021



LS.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan



prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

01-11-2019

V Olomouci dne 8. listopadu 2018

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Bc. Eliška Haasová
Název práce:	Beta testování kitu PyroMark Q48 FX Age Assay (QiaGen)
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2021
Klíčová slova:	forezní epigenetika, methylace DNA, určování věku, bisulfitická konverze, pyrosekvenování
Počet stran:	73
Počet příloh:	3
Jazyk:	český

SOUHRN

Methylace DNA je epigenetická modifikace, která má velký potenciál pro forezní účely. Na základě methylace DNA lze ve forezní praxi určit bližší údaje o analyzovaném vzorku (identifikace tělních tekutin a tkání) a o inkriminované osobě (určení fenotypových charakteristik, zdravotního stavu, životního stylu, stáří). Zejména determinace věku jedince je v kriminalistické praxi velmi důležitá. Pro určení úrovně methylace se využívají různé metody (bisulfitické sekvenování, metody založené na restričních endonukleasach, metody založené na afinitních mikročipech). Firma QIAGEN vyvinula epigenotypizační kit PyroMark Q48 FX Age Assay pro určování věku jedinců na základě polského výzkumu, který využívá techniky bisulfitického pyrosekvenování (spojení bisulfitické konverze s genotypizací pomocí pyrosekvenování).

V experimentální části této diplomové práce bylo provedeno beta testování druhé verze zmíněného kitu pro ověření jeho přesnosti na vzorcích kontrolní DNA od firmy QIAGEN a na

232 vzorcích DNA vyizolovaných z periferní krve českých dárců krve. Část testování byla provedena v rámci mezinárodní spolupráce, kterého se zúčastnily forenzní laboratoře z Dánska, Francie, Německa a USA. Úroveň methylace byla stanovena u každého vzorku u pěti markerů na konkrétních CpG místech (CpG7 pro *ELOVL2*, CpG1 pro *C1orf132*, CpG7 pro *TRIM59*, CpG1 pro *KLF14* a CpG2 pro *FHL2*). Na základě těchto hodnot byl pomocí věkového kalkulátoru od firmy BioVectis určen odhadovaný věk daného jedince. Data byla posléze statisticky analyzována a srovnána s 1. verzí kitu. Bylo zjištěno, že 2. verze kitu má mnohokrát vyšší přesnost než 1. verze. Střední absolutní odchylka byla stanovena na 3,21 let pro všechny vzorky. Nejvyšší hodnota střední absolutní odchylky byla zaznamenána u nejstarší věkové skupiny 50–63 let, a sice 4,18 let. Kit vykazoval poměrně slabou korelaci mezi jednotlivými markery a chronologickým věkem až na marker *FHL2*. Korelace mezi odhadovaným a chronologickým věkem byla naopak poměrně vysoká, a to 88,4 %.

Bibliographical identification

Author's name and surname:	Bc. Eliška Haasová
Title:	Beta testing of PyroMark Q48 FX Age Assay kit (QiaGen)
Type of thesis:	Master's thesis
Department:	Department of the Cell Biology and Genetics
Supervisor:	prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.
The year of presentation:	2021
Keywords:	forensic epigenetics, DNA methylation, age determination, bisulfite conversion, pyrosequencing
Number of pages:	73
Number of appendices:	3
Language:	Czech

SUMMARY

DNA methylation is an epigenetic modification that has great potential for forensic purposes. Based on DNA methylation, data on the analysed sample (identification of body fluids and tissues) and on the incriminated person (determination of phenotypic characteristics, health status, lifestyle, and age) can be determined. Determining the age of an individual is very important in forensic practice. Various methods are used to determine the level of methylation (bisulfite sequencing, methods based on restriction endonucleases, methods based on affinity microarrays). QIAGEN developed the PyroMark Q48 FX Age Assay epigenotyping kit for determining the age of individuals based on Polish research using bisulfite pyrosequencing techniques (combining bisulfite conversion of cytosine with genotyping by pyrosequencing).

In the experimental part of this master's thesis, beta testing of this kit was performed to verify its accuracy on control DNA samples from QIAGEN and on 232 DNA samples isolated from the peripheral blood of the Czech blood donors. Part of the testing was carried out in an

international collaboration involving forensic laboratories from Denmark, France, Germany, and the USA. The level of methylation was determined for each sample for five markers at specific CpG sites (CpG7 for *ELOVL2*, CpG1 for *C1orf132*, CpG7 for *TRIM59*, CpG1 for *KLF14*, and CpG2 for *FHL2*). Based on these values, the estimated age of the individual was determined using an age calculator from BioVectis. The data were then statistically analysed and compared with the first version of the kit. It has been discovered that the second version has several times higher accuracy than the first version. The mean absolute deviation was set at 3,21 years for all samples. The highest value of the mean absolute deviation was observed for the oldest age group 50–63 years, namely 4,18 years. The kit showed a relatively weak correlation between individual markers and chronological age except the *FHL2* marker. On the other hand, the correlation between estimated and chronological age was quite high, namely 88,4%.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: Beta testování kitu PyroMark Q48 FX Age Assay (QiaGen) vypracovala samostatně pod vedením prof. Mgr. Jiřího Drábka, Ph.D. a za využití citované literatury.

V Olomouci dne:

Bc. Eliška Haasová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce, panu prof. Mgr. Jiřímu Drábkovi, Ph.D., za jeho odborné vedení, cenné rady a připomínky a za veškerou trpělivost a čas, který mi věnoval při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Heleně Jurtíkové za její trpělivost, čas a velkou pomoc v experimentální části této práce. Děkuji také Mgr. Janě Vrbkové, Ph.D., za její ochotu, čas a pomoc při statistickém zpracování dat. Mé poděkování patří také členům Laboratoře experimentální medicíny Ústavu molekulární a translační medicíny LF UP a FNOL za jejich pomoc při práci v laboratoři a za příjemné prostředí – jmenovitě chci poděkovat Veronice Holinkové, DiS., Mgr. Barboře Koblihové a Mgr. Barboře Blumové. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mi byli po celou dobu mého studia velkou oporou.

Projekt byl podpořen grantem IGA LF UP 2021_019.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. CÍLE PRÁCE	2
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1 Epigenetika	3
3.1.1 Epigenetické modifikace	4
3.1.2 Forenzní epigenetika	7
3.2 Určování věku	9
3.2.1 Určování věku na základě methylace DNA	10
3.3 Bisulfitická konverze	12
3.3.1 Metody založené na bisulfitické konverzi	14
3.4 Masivně paralelní sekvenování	15
3.4.1 Pyrosekvenování	17
3.5 Bisulfitické sekvenování	22
3.5.1 Bisulfitické pyrosekvenování	22
3.6 Další metody analýzy methylace DNA	23
3.6.1 Analýza methylace genomu na globální úrovni	24
3.6.2 Hodnocení methylace DNA v konkrétních sledovaných regulačních oblastech či genech v celém genomu	25
3.6.3 Metody pro stanovení 5-hydroxymethylecytosinu	27
3.7. Bisulfitická pyrosekvenace pomocí PyroMark Q48 Autoprep	28
4. MATERIÁL A METODY	29
4.1 Biologický materiál	29
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky	29
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	29
4.3 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	30
4.3.1 Bisulfitická konverze	30
4.3.2 Purifikace DNA	32
4.3.3 PCR amplifikace	35
4.3.4 Genotypizace pomocí pyrosekvenování	37
5. VÝSLEDKY	40
5.1 Hodnocení analýzy pomocí PyroMark Q48 Autoprep Software a BioVectis kalkulátoru věku	40
5.2 Analýza kontrolní DNA	43
5.3 Analýza DNA z periferní krve ve třech opakováních	45

5.4 Analýza DNA z periferní krve	47
5.4.1 Korelační analýza věku	48
5.4.2 Střední absolutní odchylka	49
5.4.3 Korelační analýza methylace a věku	51
5.4.4 Korelační analýza methylace pro 2. a 1. verzi kitu	54
5.4.5 Návrhy modelů pro 2. a 1. verzi kitu.....	55
6. DISKUSE	57
7. ZÁVĚR.....	63
8. LITERATURA.....	65
9. PŘÍLOHY	73

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

5caC	5-karboxylcytosin
5fC	5-formylcytosin
5hmC	5-hydroxymethylcytosin
5mC	5-methylcytosin
AB	hybridizační pufr (annealing buffer)
AFLP	polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů
APS	adenosinfosfosulfát
ATP	adenosintrifosfát
BB	vazebný pufr (binding buffer)
BD	desulfonační pufr (desulfonation buffer)
BL	nanášecí pufr (loading buffer)
BS-Seq	bisulfitické sekvenování
BW	promývací pufr (wash buffer)
CCD	zařízení s vázanými náboji (Charge-Coupled Device)
COBRA	kombinovaná bisulfitická restrikční analýza (Combined bisulfite restriction analysis)
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytidintrifosfát
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DNMT	DNA methyltransferasa
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
DS	denaturační roztok (denaturation solution)
dsDNA	dvouvláknová DNA

dTTP	deoxythymidintrifosfát
EB	eluční pufr (elution buffer)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
HPLC-UV	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí
LC MS/MS	kapalinová chromatografie spřažená s tandemovou hmotnostní spektrometrií
lncRNA	dlouhá nekódující RNA (long non-coding RNA)
LUMA	luminometric methylation assay
MAD	střední absolutní odchylka (Mean Absolute Deviation)
MBP	methyl-CpG vazebný protein (methyl-CpG binding protein)
mRNA	mediátorová RNA
mtDNA	mitochondriální DNA
MeDIP	imunoprecipitace metylované DNA
MIRA	methylated CpG-island recovery assay
miRNA	mikroRNA
MPS	masivně paralelní sekvenování (Massively Parallel Sequencing)
MS-HRM	methylačně specifické tání s vysokým rozlišením (methylation-specific high resolution melting)
MS-MLPA	methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification
MSP	methylačně-specifická PCR
MSRE	methylačně citlivá restrikční endonukleasa
ncRNA	nekódující RNA
PacBio	Pacific Bioscience
PCR	polymerasová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
piRNA	PIWI interagující RNA (PIWI interacting RNA)
PPi	pyrofosfát

pre-mRNA	pre-mediátorová RNA
qPCR	kvantitativní PCR
r	korelační koeficient
r ²	koeficient determinace
RE	restrikční endonukleasa
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RLU	relativní luminiscenční jednotky
RRBS	bisulfitické sekvenování se sníženým zastoupením
SAM	S-adenosylmethionin
SD	směrodatná odchylka
siRNA	krátká interferující RNA (short interfering RNA)
SMRT	sekvenování jedné molekuly v reálném čase (single-molecule real-time sequencing)
snoRNA	krátká jadérová RNA (short nucleolar RNA)
SNP	bodový polymorfismus (single-nucleotide polymorphism)
snRNA	krátká jaderná RNA (short nuclear RNA)
SOLiD	Sequencing by Oligo Ligation Detection
ssDNA	jednovláknová DNA
TET	translokační enzymy
TRF	telomerové restrikční fragmenty
WGBS	celogenomové bisulfitické sekvenování
ZMW	zero mode waveguide

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Základní epigenetické modifikace	4
Obrázek č. 2: Methylace cytosinu na 5mC pomocí enzymu DNMT	6
Obrázek č. 3: Možnosti forezního epigenetického profilování jedince.....	8
Obrázek č. 4: Různé typy epigenetických hodin věku vyvinuté pro lidi a pro myši včetně počtu CpG míst a typu analyzované tkáně.	12
Obrázek č. 5: Ukázka změny sekvence u nemetylované a metylované sekvence DNA při bisulfitické konverzi a následné PCR amplifikaci.	13
Obrázek č. 6: Princip bisulfitické konverze zahrnující krok sulfonace, hydrolytické deaminace a alkalické desulfonace.....	14
Obrázek č. 7: Schematické znázornění základních kroků při sekvenování DNA pomocí různých MPS platforem.	16
Obrázek č. 8: Izolace biotinylované DNA pomocí kuliček potažených streptavidinem.....	19
Obrázek č. 9: Obecné schéma pyrosekvenace.	21
Obrázek č. 10: Přehled metod analýzy methylace DNA.....	23
Obrázek č. 11: Strukturní vzorce 5-hydroxymethylecytosinu, 5-formylecytosinu a 5-karboxylcytosinu	27
Obrázek č. 12 A, B: Stripy s bisulfitickou reakcí po přidání DNA ochranného pufru před promícháním (A) a po promíchání (B).....	31
Obrázek č. 13: Připravený adaptér pro rotor u QIAcube.	33
Obrázek č. 14: Rozmístění vzorků dle jejich počtu ve třepačce a centrifuze u QIAcube	33
Obrázek č. 15: QIAcube připravený pro purifikaci DNA.....	34
Obrázek č. 16: Nastavení běhu pro pyrosekvenaci v PyroMark Q48 Autoprep Software.....	38
Obrázek č. 17 A, B: Pyrosekvenátor PyroMark Q48 Autoprep při přípravě na pyrosekvenaci (A) a při pyrosekvenaci (B).....	39
Obrázek č. 18: Výsledek pyrosekvenační analýzy zpracovaný PyroMark Q48 Autoprep Software.	41
Obrázek č. 19: Kalkulátor pro odhad věku dostupný na webu BioVectis.	43
Obrázek č. 20: Korelační grafy závislosti mezi chronologickým a odhadovaným věkem u 1. a 2.verze kitu.	49
Obrázek č. 21: Korelační graf pro CpG7 u <i>ELOVL2</i> ukazující závislost mezi % methylace a věkem u obou kitů.	51
Obrázek č. 22: Korelační graf pro CpG1 u <i>C1orf132</i> ukazující závislost mezi % methylace a věkem u obou kitů.	52
Obrázek č. 23: Korelační graf pro CpG7 u <i>TRIM59</i> ukazující závislost mezi % methylace a věkem u obou kitů.	52

Obrázek č. 24: Korelační graf pro CpG1 u <i>KLF14</i> ukazující závislost mezi % methylace a věkem u obou kitů.	52
Obrázek č. 25: Korelační graf pro CpG2 u <i>FHL2</i> ukazující závislost mezi % methylace a věkem u obou kitů.	53
Obrázek č. 26 : Korelace úrovně methylace pro <i>ELOVL2</i> , <i>C1orf132</i> , <i>TRIM59</i> , <i>KLF14</i> a <i>FHL2</i> pro oba kity.....	54

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Jednotlivé komponenty pro bisulfitickou konverzi a jejich objemy pro 1 reakci.	30
Tabulka č. 2: Protokol bisulfitické konverze.	31
Tabulka č. 3: Rozmístění reagensů v QIAcube.	32
Tabulka č. 4: Objem a koncentrace chemikálií pro PCR amplifikaci genu <i>ELOVL2</i>	35
Tabulka č. 5: Objem a koncentrace chemikálií pro PCR amplifikaci genu <i>C1orf132</i>	36
Tabulka č. 6: Objem a koncentrace chemikálií pro PCR amplifikaci genu <i>TRIM59</i>	36
Tabulka č. 7: Objem a koncentrace chemikálií pro PCR amplifikaci genu <i>KLF14</i>	36
Tabulka č. 8: Objem a koncentrace chemikálií pro PCR amplifikaci genu <i>FHL2</i>	36
Tabulka č. 9: Protokol PCR amplifikace.	37
Tabulka č. 10: Přehled sekvencí, pozic v genomu a CpG pozic u sekvenovaných genů.	37
Tabulka č. 11: Procenta methylace u plně methylované a plně nemethylované kontrolní DNA a jejich směsi v poměru 1:1.	44
Tabulka č. 12: Průměr procent methylace u vzorků kontrolní DNA u všech do testování zapojených laboratoří.	44
Tabulka č. 13: Hodnoty Směrodatné odchylky u vzorků kontrolních DNA.	45
Tabulka č. 14: Procenta methylace ve třech opakováních s jejich průměrnými hodnotami pro všechny markery u 15 jedinců ve věku 20–55 let.	45
Tabulka č. 15: Směrodatná odchylka úrovně methylace pro každý triplet a jejich průměr u všech markerů.	46
Tabulka č. 16: Odhad věku pro 15 jedinců na základě hodnot z Tabulky č. 14 a jejich skutečný věk a věková kategorie.	47
Tabulka č. 17: Hodnoty MAD pro jednotlivé věkové skupiny a celkový MAD pro 2. a 1. verzi kitu.	50
Tabulka č. 18: Hodnoty MAD pro modely 1A, 1B, 2A a 2B pro 1. a 2. verzi kitu.	56
Tabulka 19: Hodnoty MAD pro jednotlivé věkové kategorie u 2. a 1. verze kitu a u polské (Zbieć-Piekarska <i>et al.</i> , 2015) a korejské (Cho <i>et al.</i> , 2017) studie.	59

1. ÚVOD

Epigenetika je poměrně nový obor, podobor genetiky, který se zabývá studiem změn v genové expresi, které nejsou vyvolány změnou v sekvenci nukleotidů DNA. Jde tedy o změnu fenotypu bez změny genotypu, na níž se uplatňují různé epigenetické mechanismy.

Jedním z těchto mechanismů je methylace DNA, konkrétně methylace 5. uhlíku cytosinu. Tato modifikace ovlivňuje expresi různých genů a je důležitá pro udržení homeostáze. Deregulace v mechanismu methylace DNA může vést k patogenním stavům a vyvolat různé nemoci, jako je například rakovina. Methylace DNA může být ovlivněna různými faktory, jako je životní styl, socioekonomický status, vliv životního prostředí, zdravotní stav, ale třeba i věk, proto se jeví jako dobrý marker ve forenzních vědách. Určování věku je jednou z jejích hlavních aplikací, jež se může využít pro dopadení pachatele trestného činu.

Existuje mnoho metod pro odhad věku na základě úrovně DNA methylace v konkrétních CpG lokusech; jedna z nejpoužívanějších metod je založena na bisulfitickém pyrosequenování. Na jejím základě je založena i metoda určování věku od německé firmy QIAGEN.

Ověření přesnosti nové verze kitu PyroMark Q48 FX Age Assay firmy QIAGEN k odhadu věku je cílem experimentální části této diplomové práce.

2. CÍLE PRÁCE

- ❖ Vypracování rešerše ohledně problematiky určování věku pomocí měření methylace DNA.
- ❖ Provedení validace kitu PyroMark Q48 FX Age Assay podle rozpisu QIAGEN a v rámci mezinárodní spolupráce.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

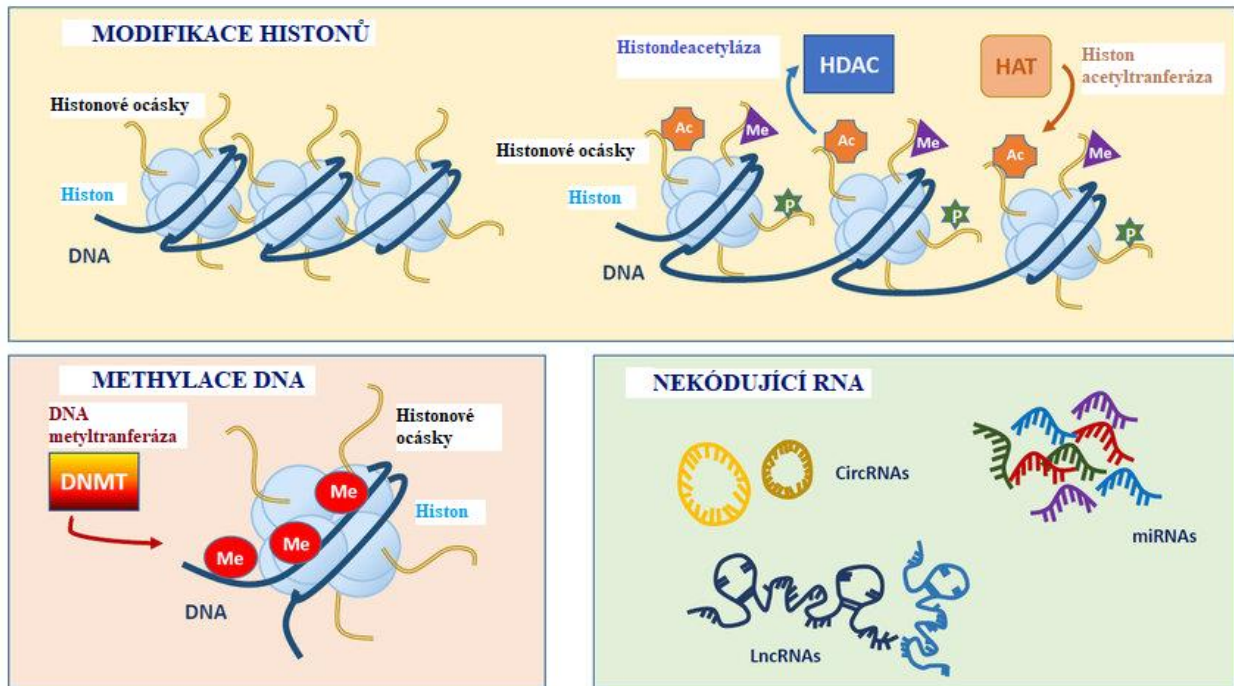
3.1 Epigenetika

Epigenetika je vědní podobor genetiky, který se zabývá dědičnými změnami genové exprese, které nejsou vyvolány změnou sekvence nukleotidů DNA. Jde tedy o změnu fenotypu bez změny genotypu. Epigenetické změny se v genomu vyskytují pravidelně, ale mohou být také ovlivněny mnoha faktory v průběhu života jako například věkem, životním stylem, prostředím a zdravotním stavem. Některé epigenetické změny mohou mít škodlivé účinky na organismus a mohou vést k nemocem, jako je například rakovina (Egger *et al.*, 2004).

Epigenetika, jak je chápána dnes, vznikla teprve v 80. letech 20. století. První epigenetické myšlenky můžeme najít na počátku 19. století v díle francouzského biologa Jeana-Baptista Lamarcka *Philosophie zoologique*. Lamarck je považován za autora první evoluční teorie, která je postavena na představě, že organismy se adaptují na podmínky vnějšího prostředí tím, že se vyvíjejí. Předpokládal také, že nově získané znaky se dědičně přenášejí do dalších generací. Na tyto myšlenky navazuje současná epigenetika. Pojem epigenetika, kterým označil spojení genetiky a vývojové biologie, zavedl ve 40. letech 20. století britský vývojový biolog Conrad Hal Waddington. Waddington chtěl tímto termínem vyjádřit souhrn změn exprese genů, jejímž následkem dochází k rozrůznění v ontogenezi. Waddington také formuloval teorii epigenetické krajiny, která pojednává o genové regulaci embryogeneze. Ve svých experimentech s *Drosophilou melanogaster* zjistil, že změna vyvolaná při embryogenezi je přenášena do dalších generací. V 70. a 80. letech 20. století došlo k objevení modifikací DNA, jako je methylace DNA a její vliv na nádorové bujení, dvojicí amerických vědců Andrewem P. Feinbergem a Bertem Vogelsteinem. Také byla objevena konkrétní methylace cytosinu britským vědcem Robinem Hollidayem. Dalším zlomem bylo v roce 1984 objevení genového imprintingu pomocí experimentu Davora Soltera a Azima Suraniho, kteří provedli přenos jader po fertilizaci myších oocytů. Posledním velkým objevem je proces RNA interference, za který získali v roce 2006 Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství američtí vědci Craig Mello a Andrew Fire (Vyskot, 2010).

3.1.1 Epigenetické modifikace

Základními epigenetickými modifikacemi jsou modifikace histonů, interakce mediátorové RNA (mRNA) s nekódujícími RNA (ncRNA) a methylace DNA (viz Obrázek č. 1) (Egger *et al.*, 2004).



Obrázek č. 1: Základní epigenetické modifikace (upraveno dle Coco *et al.*, 2019).

3.1.1.1 Modifikace histonů

Histonový oktamer je proteinový komplex, který se skládá z dimerů histonů H2A, H2B, H3, H4, kolem kterého se obtáčí molekula DNA v jádře. Spojením histonů s DNA vznikají nukleozomy, které se dále formují do chromatinu. Modifikace histonů se děje pomocí posttranslační methylace, acetylace, fosforylace, ubikvitinace, sumoylace a ADP-ribosylace, které jsou klíčové pro specifické změny chromatinu, a tím pádem mají vliv na genovou expresi. Histonové modifikace mají za následek transkripční inaktivaci či aktivaci chromatinu a jsou výsledkem navázání specifických chemických skupin (dle typu modifikace) na N-termální konce histonů („histonové ocásky“) za pomoci příslušných enzymů (např.: histon methyltransferasa pro methylici, histon acetyltransferasa pro acetylaci, histon fosforylasa pro fosforylaci atd.). Existuje tzv. histonový kód, jenž je téměř univerzální, a který determinuje modifikaci konkrétní aminokyseliny v konkrétním histonu, která vede k aktivaci či inaktivaci transkripce (např.: methylace lysinu 9 v H3 histonu vede k transkripční inaktivaci, zatímco

methylace lysinu 4 v témže histonu vede k transkripční aktivaci). Všechny tyto modifikace jsou reverzibilní díky specifickým enzymům (např.: histon demethylasa, histon deacetylasa, histon fosfatasa atd.). Díky tomu může dojít ke změně exprese genů na základě enviromentálních nebo fyziologických změn (Masopust, 2010; Vyskot 2010).

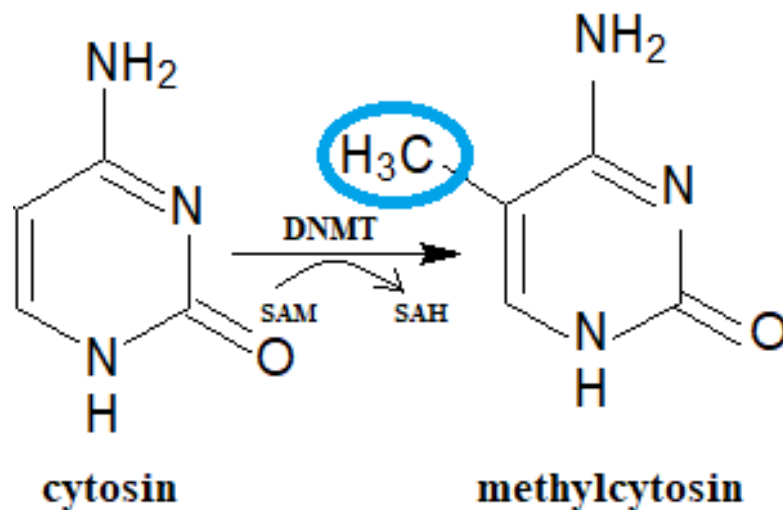
3.1.1.2 Nekódující RNA

Nekódující RNA (ncRNA) je funkční molekula RNA, která vzniká transkripcí DNA, ale na rozdíl od kódující RNA se neúčastní procesu proteosyntézy. Funkcí ncRNA je regulace genové exprese na transkripční a posttranskripční úrovni. NcRNA se dělí na dlouhé ncRNA (lncRNA z anglického long non-coding RNA), které jsou delší než 200 bp a krátké ncRNA, které se dále dělí na krátké jaderné RNA (snRNA z anglického short nuclear RNA), krátké jadérové RNA (snoRNA z anglického short nucleolar RNA), mikroRNA (miRNA), krátké interferující RNA (siRNA z anglického short interfering RNA) a PIWI interagující RNA (piRNA z anglického PIWI interacting RNA). V lidském genomu se nachází více než 10 000 lncRNA a jejich funkce se vzájemně liší, například lncRNA XIST se uplatňuje při inaktivaci jednoho z X chromozomů v samičích buňkách u savců. SnRNA se nachází v lidských buňkách ve vysoké koncentraci a účastní se úpravy pre-mediátorové RNA (pre-mRNA); konkrétně se účastní rozpoznávání a vystřížení intronů a následného spojení exonů. Obdobnou funkci má snoRNA, která se účastní úprav ribozomální RNA (rRNA) a tvorby ribozomů. MiRNA a siRNA jsou 21–24 bp dlouhé RNA s téměř totožnou úlohou, ale s rozdílným způsobem vzniku, které se účastní procesu RNA interference. Byly objeveny v 90. letech 20. století u *Caenorhabditis elegans* a nachází se téměř u všech mnohobuněčných organismů. Tyto krátké RNA se váží k mRNA, kterou tím umlčí a znemožní tak její překlad do proteinu. V některých případech je mRNA po navázání degradována. Jejich funkce je tedy regulace produkce proteinů během buněčné diferenciaci a zárodečného vývoje. Nejpozději objevenou skupinou (v roce 2006) jsou piRNA, které mají důležitou roli při tvorbě spermií (Staněk, 2015).

3.1.1.3 Methylace DNA

Methylace DNA je epigenetická modifikace DNA, při které dochází ke kovalentnímu přenosu methylové skupiny na 5. uhlíkový atom pyrimidinového kruhu cytosinu pomocí enzymu z rodiny DNA methyltransferasas (DNMT). Vzniká tak sloučenina 5-methylcytosin

(5mC) (viz Obrázek č. 2). DNMT získávají methylovou skupinu pro přenos z S-adenosylmethioninu (SAM). U rostlin je methylace cytosinu distribuována jak v symetrických sekvencích, tak v asymetrických sekvencích. U savců dochází k methylaci cytosinu ve všech sekvencích, ale naprostá většina je zastoupena v CpG místech (oblast DNA, kde je cytosin následován guaninem, tedy 5'—C—fosfát—G—3') somatických buněk. Methylace DNA je obvykle odstraněna během tvorby zygoty a znovu obnovena v embryu během uhníždění vajíčka v děloze. Většina DNA methylace je nezbytná pro normální vývoj a má důležitou roli v mnoha procesech, jako je inaktivace chromozomu X, genomový imprinting, potlačení transpozice a transkripce repetitivních sekvencí atd. Při její deregulaci může dojít k vážným poruchám a onemocněním (Jin *et al.*, 2011).



Obrázek č. 2: Methylace cytosinu na 5mC pomocí enzymu DNMT (vytvořeno v programu ChemSketch).

V genomu se nacházejí i tzv. CpG ostrůvky, což jsou úseky DNA dlouhé až 1000 bází, které mají vyšší frekvenci CpG dinukleotidů než zbytek genomu, ale většinou nejsou methylovány. Až 70 % promotorů genů se nachází v asociaci s CpG ostrůvkami. Methylace CpG ostrůvků vede ke stabilnímu umlčování genové exprese. Role CpG ostrůvků při regulaci genové exprese stále není zcela jasná a jsou zapotřebí její další studie. Rodina DNMT zahrnuje tři enzymy, které přímo katalyzují přidání methylové skupiny na DNA, a sice DNMT1, DNMT3A a DNMT3B. Enzym DNMT1 je tzv. udržovací methyltransferasa, která methyluje převážně hemimethylovanou DNA. Během replikace DNA se DNMT1 váže na nově syntetizované vlákno a dle vzoru vlákna původního toto vlákno přesně methyluje. Kromě této funkce má také schopnost opravy methylace. Enzymy DNMT3A a DNMT3B jsou si velmi strukturně i funkčně

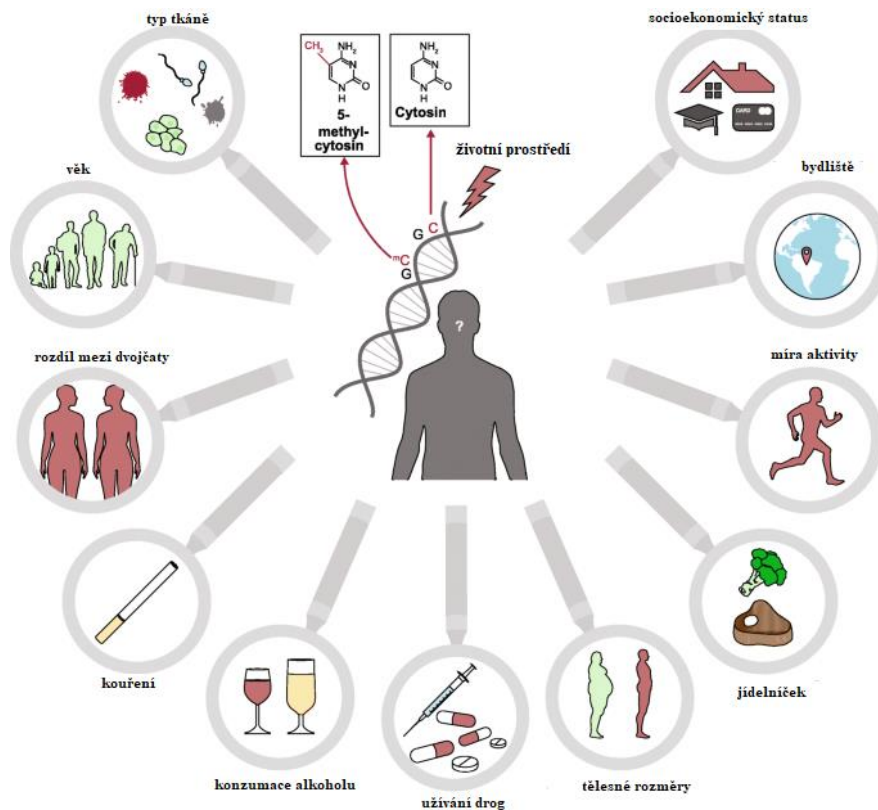
podobné, liší se pouze vzorcem genové exprese. Tyto DNMT provádějí metylaci *de novo*. Existuje i enzym DNMT3L, který sám o sobě nemá katalytickou funkci, ale stimuluje aktivitu DNMT3A a DNMT3B. V genomu může dojít i k procesu demethylace, který je zprostředkován translokačními enzymy (TET). TET dodávají hydroxylovou skupinu za vzniku 5-hydroxymethylcytosinu (5hmC), který může být u savců převeden zpět na cytosin (Moore *et al.*, 2012).

Byly objeveny dva různé mechanismy, kterými DNA methylace potlačuje genovou expresi a umlčuje konkrétní genové oblasti. První z mechanismů je založen na zabránění přístupu transkripčních faktorů k DNA. Druhý mechanismus je založen na vazbě methyl-CpG vazebných proteinů (z anglického methyl-CpG binding proteins, MBP) na 5mC. Tyto proteiny mají mnohokrát vyšší afinitu k methylované DNA než k nemethylované. Proteiny MBP poskytují spojení mezi methylací DNA a modifikací chromatinu tím, že se spojují s různými modifikátory chromatinu, což vede ke zvýšení kondenzace chromatinu, a tím k represí transkripce. První z identifikovaných MBP je protein MeCP2, jehož mutace u lidí způsobuje Rettův syndrom (Bogdanović *et Veenstra*, 2009).

3.1.2 Forezní epigenetika

Forezní epigenetika se zabývá uplatněním epigenetiky při vyšetřování zločinů. Forezní vědy používají jako důkazní materiál pro ztotožnění nejčastěji DNA, která se získává z biologických stop. Biologickou stopou mohou být epitelové buňky nebo tělní tekutiny, jako je krev, sperma, sliny, vaginální tekutina, moč, pot. Získaná DNA se podrobí profilování pro identifikaci dané osoby. Profil DNA zůstává nezměněný po celý život jedince, nelze z něj tedy vyčíst nedědičné, dynamické informace jako přítomnost nemoci, věk atd. Další limitací je, že profil neumožňuje určení tkáňového původu stopy. Naproti tomu forezní epigenetika je využitelná pro určení fenotypových charakteristik, věku, pro identifikaci tělních tekutin a tkání, pro rozlišení jednovaječných dvojčat, pro získání informací o okolnostech vedoucích ke zranění nebo smrti a pro získání informací o patologických stavech. Většina epigenetických metod je založena na charakterizaci methylace DNA, neboť se jedná o specifickou chemickou modifikaci, která slouží jako vhodný detekční a diagnostický biomarker pro vybraný gen. Míra methylace je proměnná v závislosti na environmentálních a dalších faktorech (viz Obrázek č. 3). Analýza methylace vykazuje vysokou citlivost a specifitu. Vzhledem k tomu, že metody analýzy methylace využívají jako vzorek extrahovanou DNA, dochází tak k minimální spotřebě

a zničení fyzického materiálu, což je při řešení kriminálních případů zásadní. Forenzní vědci tak nemusí řešit dilema, které testy provést při limitovaném množství vzorku, aby neztratili rozhodující důkazní materiály. Další výhodou je možnost využití standardních protokolů (Kader *et* Ghai, 2015).



Obrázek č. 3: Možnosti forenzního epigenetického profilování jedince (upraveno dle Vidaki *et* Kayser, 2017).

Příkladem aplikace forenzní epigenetiky je identifikace tělních tekutin a tkání. Ta funguje na principu hodnocení diferencially methylovaných oblastí v různých tkáních. Ač se stejný gen nachází ve všech tělních tkáních, jen v některých z nich je exprimován a v některých je pomocí methylace DNA umlčen. Někdy samotná identita tekutiny může být dostatečnou informací pro ovlivnění vyšetřování případu. Identifikace tělesných tekutin se může využít třeba při nalezení směsi na místě činu, kdy nalezená skvrna může obsahovat více tělních tekutin od více zůstavitelů stopy. Další aplikací je rozlišení jednovaječných dvojčat, které mají téměř identický genom, ale mohou se lišit epigenomem, ve kterém se odráží odlišná environmentální historie. Úspěšnost epigenetického rozlišení jednovaječných dvojčat se zvyšuje s věkem a s rozdílností v environmentálních inzultech (jedno z dvojčat je kuřák a druhé ne). Další důležitou aplikací je určení věku dané osoby (Virkler *et* Lednev, 2009; Williams, 2018).

3.2 Určování věku

Ve forenzních vědách je určování věku důležité jak pro odhalení neznámého pachatele trestného činu, tak i pro identifikaci lidských ostatků. Určování věku se může využít i při kontrole nelegálních imigrantů, kdy aplikovatelnost práva na azyl závisí na věku jedince. Existují různé metody vyznačující se různou přesností. Rutinně se využívají metody založené na morfologii zubů, kostnatění epifyzy a elongaci kostí. Chemické metody zahrnují sledování racemizace kyseliny asparagové, akumulace olova, síťování kolagenu, chemického složení zubů a glykosylace proteinů (Bakaert, 2015).

Dále existují molekulárně genetické metody, jejichž výhodou při odhadu věku je, že jsou v zásadě použitelné téměř pro každou tkáň obsahující DNA. Jedním z prvních zkoumaných genetických markerů pro určování věku byla mitochondriální DNA (mtDNA). Mitochondrie jsou oxidační centra buněk, ve kterých dochází k oxidativní fosforylaci, kterou doprovází uvolňování volných radikálů. Tím je mtDNA neustále pod oxidačním stresem, což vede k aktivní mutagenезi a ke kumulaci mutací se stárnutím. Ve forenzních vědách se využívá převážně bodových mutací a delecí. Akumulace mutací v mtDNA se ale velmi liší mezi jednotlivci i mezi tkáněmi jednoho jedince. Tato metoda je tedy při odhadování věku poměrně hrubým ukazatelem a umožňuje pouze dělení vzorků podle věkových skupin, ale neumožňuje odhad věku s přesností dostatečnou pro forenzní vědy (Zapico *et al.*, 2016; Zolotareno *et al.*, 2019).

Další způsob je založen na sledování zkracování telomer, ke kterému dochází při každém buněčném dělení. Existují různé metody k určení délky telomer, jako je polymerasová řetězová reakce (PCR), metoda telomerových restrikčních fragmentů (TRF), fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Byly provedeny různé studie, které však zaznamenaly velkou chybovost způsobenou vysokou variabilitou délky telomer i u jedinců stejného věku. Délku telomer ovlivňují i další faktory, jako jsou nemoci, životní styl jedince, dědičnost, díky čemuž není tato metoda přesná a je spíše vhodná pro aplikaci v medicíně než ve forenzních vědách (Montpetit *et al.*, 2014; Zolotareno *et al.*, 2019).

Dále se dá využít kvantifikace přeskupení subgenů receptorů T buněk v krvi. Tato technika dokáže rozdělit jedince do věkových skupin po 20 letech, což je přesnost, která nedostačuje pro implementaci metody do forenzního vyšetřování. Nejvhodnější technikou pro predikci věku se jeví určování na základě změny hladiny methylace DNA (Parson, 2018).

3.2.1 Určování věku na základě methylace DNA

Chronologický věk není přesným ukazatelem procesu stárnutí, proto byl navržen koncept tzv. biologického věku, který předpovídá stav stárnutí osoby či orgánů. K určení biologického věku jsou zapotřebí spolehlivé biomarkery stárnutí, na jejichž identifikaci se pracuje už od 80. let 20. století. Jako nejslibnějšími markery pro predikci věku se ukázaly biomarkery založené na methylaci DNA, které mají mnoho výhod, např. vztahují se na všechny zdroje DNA a na celé věkové spektrum (Horvath *et al.*, 2018).

Bylo provedeno mnoho studií, které ukazují, že methylace DNA v normálních (nenádorových) buňkách se během procesu stárnutí mění. Využití nových typizačních technologií, zejména čipů Illumina Infinium 27k arrays a Illumina 450k arrays, umožnilo velmi přesně stanovit úroveň methylace DNA na desítkách tisíc CpG míst. Tři nezávislé studie zjistily, že ke zvýšení methylace DNA související s věkem dochází přednostně na CpG ostrůvcích, na promotorech bivalentních domén chromatinu klíčových vývojových genů a na cílových místech proteinové skupiny Polycomb. Další dvě studie ukázaly, že hypermethylace spojená s věkem probíhá přednostně u promotorů s vysokou hustotou CpG, které se často nacházejí po směru transkripce od klíčových vývojových genů. Tyto studie také potvrdily, že ztráta methylace postihuje CpG v oblasti s nízkou CpG hustotou a většina z těchto míst byla původně methylovaná. Z toho vyplývá, že s přibývajícím věkem dochází k deregulaci mechanismu odpovědného za udržení methylace DNA a úroveň methylace se postupně lineárně mění. Tento proces se nazývá epigenetický drift (Maegawa *et al.*, 2010; Rakyan *et al.*, 2010; Teschendorff *et al.*, 2010; Heyn *et al.*, 2012; Hannum *et al.*, 2013; Teschendorff *et al.*, 2013).

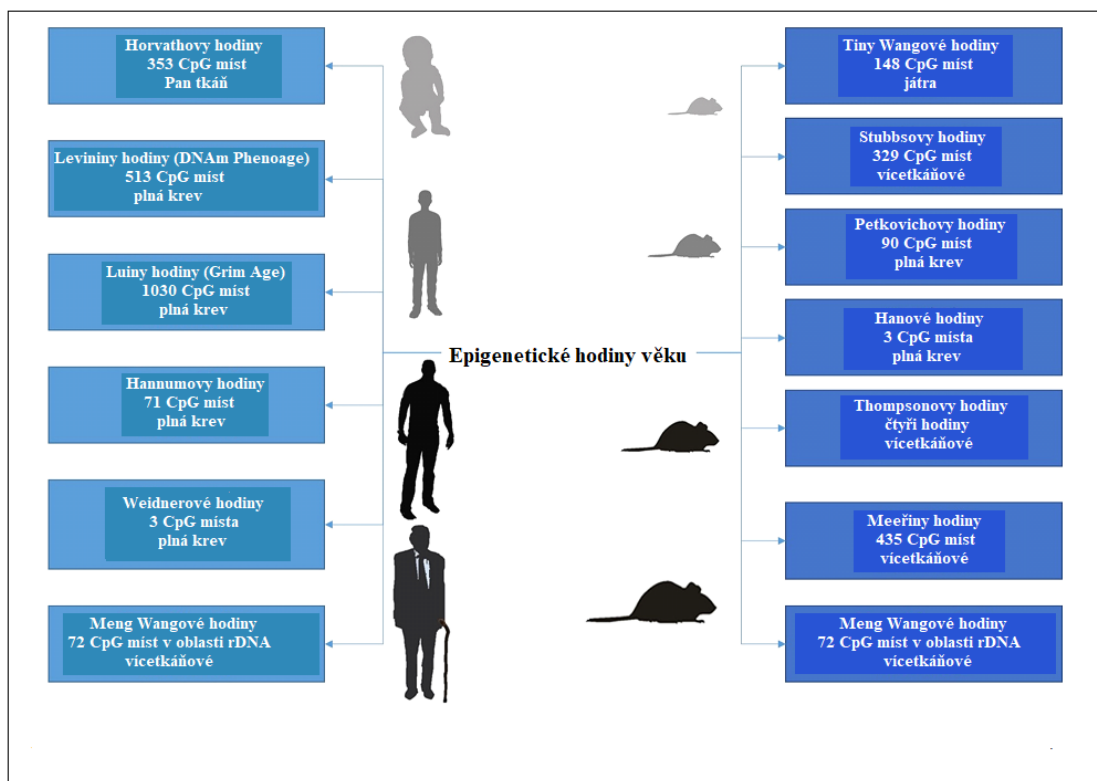
Epigenetický drift není jednotný napříč genomem a je značně variabilní mezi stejně starými jedinci, což dokazuje, že změny methylace nejsou geneticky naprogramované. Na druhou stranu jsou změny methylace vysoce konzervativní v rámci druhu a vyšší drift vykazují proliferující tkáně. Vysvětlení epigenetického driftu je tedy přítomnost chyb spojených s replikací pro udržení epigenetických stavů. Dokonce lze do jisté míry předpovědět driftem postižené geny dle pozice v genomu (např. dle blízkosti retrotranspozonu). Vazba transkripčních faktorů, kondenzace chromatinu nebo hustota nukleozomů jsou faktory, které opravují epigenetické chyby nebo zabraňují jejich vzniku. Naopak existují faktory, které epigenetický drift indukují, jako chronický zánět plic, jater, tlustého střeva, žaludku a jícnu. Další faktory jako expozice chemickým látkám v životním prostředí, např.: různým kovům (nikl, arsen), polutantům v ovzduší (benzen), proliferátorům peroxisomů (kyselina di/trichloroctová), endokrinním disruptorům (dioxiny), modifikuje epigenetické změny

a pravděpodobně ovlivňuje drift, ale rozsah jejich účinku není zcela prozkoumán (Baccarelli *et* Bollati, 2009; Issa, 2014).

Na základě biomarkerů stárnutí vycházejících z methylace DNA byly vytvořeny tzv. epigenetické hodiny pro určení stáří. Epigenetické hodiny se skládají ze souborů CpG míst, jejichž úroveň methylace DNA stanovuje biologický věk dané osoby. Tyto hodiny pomocí matematického algoritmu odhadují věk z kombinace souborů CpG míst; tento věk se označuje jako epigenetický. Existuje mnoho typů epigenetických hodin (viz Obrázek č. 4), většinu z nich lze však aplikovat pouze na jeden typ tkáně jako např. tzv. Hannumovy hodiny, které využívají k odhadu věku hladinu methylace DNA v krvi. V roce 2013 vyvinul vědec Steve Horvath tzv. Horváthovy hodiny, které se dají aplikovat na téměř jakýkoliv typ lidské tkáně s výjimkou spermatu. Horváthovy hodiny jsou založeny na hodnotách DNA methylace u 353 individuálních CpG míst, kde 193 CpG míst pozitivně a 160 CpG míst negativně koreluje s věkem. Epigenetické hodiny mohou také odhalit příčinu zrychlení biologického stárnutí, což jsou většinou různé chronické degenerativní onemocnění, které mohou vést k předčasné smrti. Epigenetické hodiny mohou sloužit jako biomarkery pro predikci těchto nemocí (Horvath, 2013; Salameh *et al.*, 2020;).

Pro detekci methylace DNA existují různé metody. Jednou z nejvyžívanějších je metoda bisulfitické sekvenace (BS-Seq), která spojuje metodu bisulfitické konverze s technikami masivně paralelního sekvenování (MPS) (Guerrero-Bosagna, 2013).

V případě spojení s pyrosekvenací se metoda nazývá bisulfitická pyrosekvenace, která kvantitativně stanovuje metylaci DNA úseků až do délky 115 bází (Bassil *et al.*, 2013).



Obrázek č. 4: Různé typy epigenetických hodin věku vyvinuté pro lidi a pro myši včetně počtu CpG míst a typu analyzované tkáně (upraveno dle Salameh *et al.*, 2020).

3.3 Bisulfitická konverze

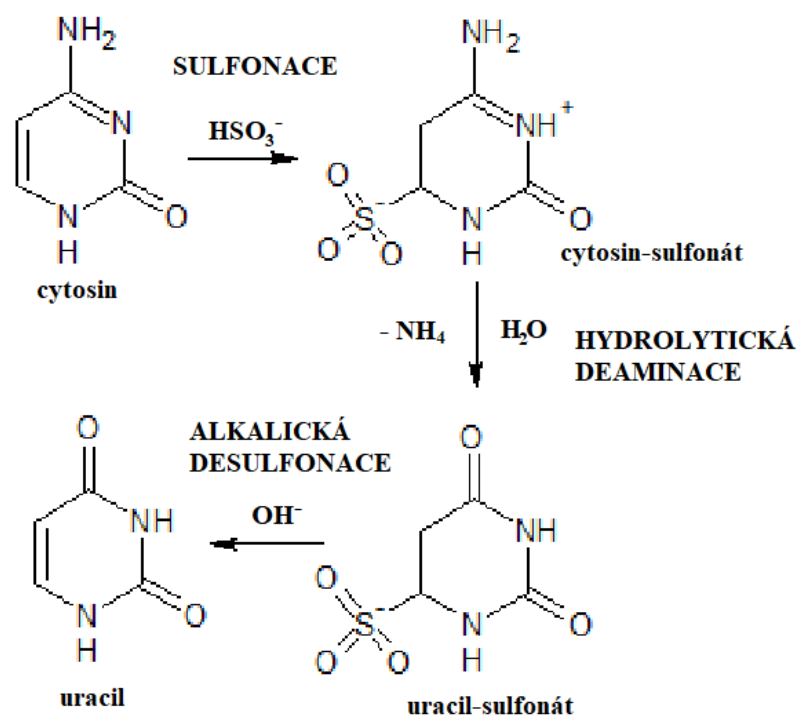
Methylace cytosinu byla poprvé stanovena v 60. letech 20 století. Existují různé metody pro její identifikaci; zásadním zlomem bylo vyvinutí metody bisulfitické konverze australskou genetičkou Mariannou Frommerovou v roce 1992 (Vyskot, 2010).

Její metoda spočívá v konverzi cytosinu na uracil u jednovláknové DNA (ssDNA) pomocí hydrogensířičitanu sodného (NaHSO_3) a v následné amplifikaci modifikované DNA pomocí PCR. Jako vzorek využila lidskou DNA z placenty, spermií, jater a buněčné linie HeLa a úroveň methylace stanovovala v lidském kininogenu. Hydrogensířičitan sodný v denaturované ssDNA přednostně deaminuje cytosinová rezidua za vzniku uracilu, ale s 5mC téměř vůbec nereaguje. Při následné PCR amplifikaci dochází k převedení uracilů (dřívějších cytosinů) na thyminy, ale 5mC rezidua jsou amplifikována jako cytosiny (viz Obrázek č. 5). Dochází tak k rozlišení methylované DNA od nemethylované. Bisulfitická konverze vede k produktům, ve kterých protilehlé řetězce DNA již nejsou komplementární. Je možné navrhnout dva páry PCR primerů, kde každý pár je specifický pro jeden z bisulfiticky převedených řetězců DNA (Frommer *et al.*, 1992).

nemethylovaná DNA							
původní sekvence DNA	G	C	A	T	C	A	C
bisulfiticky konvertovaná DNA	G	U	A	T	U	A	U
PCR amplifikovaná DNA	G	T	A	T	T	A	T
methylovaná DNA							
původní sekvence DNA	G	C met	A	T	C met	A	C met
bisulfiticky konvertovaná DNA	G	C	A	T	C	A	C
PCR amplifikovaná DNA	G	C	A	T	C	A	C

Obrázek č. 5: Ukázka změny sekvence u nemethylované a methylované sekvence DNA při bisulfitické konverzi a následné PCR amplifikaci. Legenda: A = adenin; G = guanin; T = thymin; U = uracil; C = cytosin; C met = methylovaný cytosin.

Bisulfitická konverze je považovaná za zlatý standard pro detekci methylace DNA, neboť je jak kvalitativní, tak kvantitativní a zároveň má potenciál identifikovat 5mC s přesností na jeden pár bází. Dříve tato metoda vyžadovala působení hydrogensířičitanu sodného přes noc, což způsobovalo nepříjemné poškození DNA. V dnešní době je celý proces konverze včetně purifikace bisulfiticky konvertované DNA proveden za méně než 2 hodiny, takže poškození DNA je menší. Bisulfitická konverze zahrnuje 3 základní kroky (viz Obrázek č. 6). V prvním kroku nastává sulfonace, kdy v pozici C-6 cytosinu dochází k nukleofilní adici hydrogensířičitanového aniontu. Ve druhém kroku výsledný cytosin-sulfonát prochází rychlou hydrolytickou deaminací za vzniku 5,6-dihydrouracil-6-sulfonátu, který je derivátem uracil-sulfonátu. Ve třetím kroku dochází k alkalické desulfonaci, kde je sulfonátová skupina odstraněna, čímž vzniká uracil. V případě 5mC je tato reakce blokována extrémně nízkou reakční rychlostí tvorby 5-methyl-6-dihydrocytosin-6-sulfonátu, a proto nedochází ke konverzi na uracil (Kundu *et al.*, 2020).



Obrázek č. 6: Princip bisulfitické konverze zahrnující krok sulfonace, hydrolytické deaminace a alkalické desulfonace (vytvořeno v programu ChemSketch).

3.3.1 Metody založené na bisulfitické konverzi

Byla vyvinuta řada metod odvozených od bisulfitické konverze pro rychlou a přesnou analýzu methylace. Jednou z nejpoužívanějších je methylačně-specifická PCR (MSP), jejíž výhodou je rychlost, citlivost a jednoduchost; není ale dostatečně kvantitativní. Tato metoda využívá specifických primerů odlišných pro konvertovanou methylovanou a nemethylovanou DNA. Primery pro methylovanou DNA detekují nekonvertované cytosiny a primery pro nemethylovanou DNA detekují thyminy převedené z cytosinů. Produkty jsou poté zobrazeny za pomoci gelové elektroforézy. Další metodou je MethyLight, která kombinuje MSP techniku s fluorescencí pomocí TaqMan sondy. TaqMan sonda má na 5'konci fluorofor a na 3'konci zhášec, který zabraňuje fluorescenci fluoroforu. Při PCR je sonda hybridizována s DNA a DNA polymerasa svou exonukleasovou aktivitou sondu rozloží, čímž se separuje fluorofor od zhášec a dojde k emisi fluorescence. V případě, že sondy s DNA nehybridizují, k fluorescenci nedochází. Tato metoda umožňuje kvantifikaci a je vysoce specifická, ale TaqMan sondy jsou drahé (3000 Kč za sondu vs. 200 Kč za primer). Kombinovaná bisulfitická restriční analýza, tzv. COBRA analýza (z anglického Combined bisulfite restriction analysis), je technika spojující bisulfitickou konverzi se štěpením pomocí restričních endonukleas (RE) po PCR

amplifikaci. PCR produkty jsou posléze separovány pomocí elektroforézy v denaturujícím gelu a z poměru štěpených/neštěpených produktů lze zjistit stupeň methylace. Methylačně specifické tání s vysokým rozlišením, tzv. MS-HRM analýza (z anglického methylation-specific high resolution melting), je založena na odlišné teplotě tání dvouvláknové DNA (dsDNA). Podstatou metody je rozdílný počet vodíkových můstků mezi bázemi – cytosin s guaninem jsou spojeny třemi vodíkovými můstky, adenin s thyminem pouze dvěma můstky. Vyšší podíl cytosinu s guaninem způsobuje pevnější vazbu mezi vlákny dsDNA, což má za následek vyšší teplotu tání potřebnou k disociaci na jednotlivé řetězce. Při MS-HRM je nejdříve provedena bisulfitická konverze dané DNA a následně je DNA amplifikována v přítomnosti fluorescenčního interkalačního barviva. Množství methylace je stanoveno na základě poklesu fluorescence závislé na rostoucí teplotě. Plně methylovaná a plně nemethylovaná DNA jsou použity jako standardy, podle kterých je určen stupeň methylace DNA. Tato metoda je poměrně levná a citlivá, ale vyžaduje DNA bohatou na CpG dinukleotidy. Pro DNA s nižším obsahem CpG lze aplikovat obměněnou metodu dMS-HRM s digitální PCR, při níž se používá naředěný vzorek (Bartošík *et* Ondroušková, 2016).

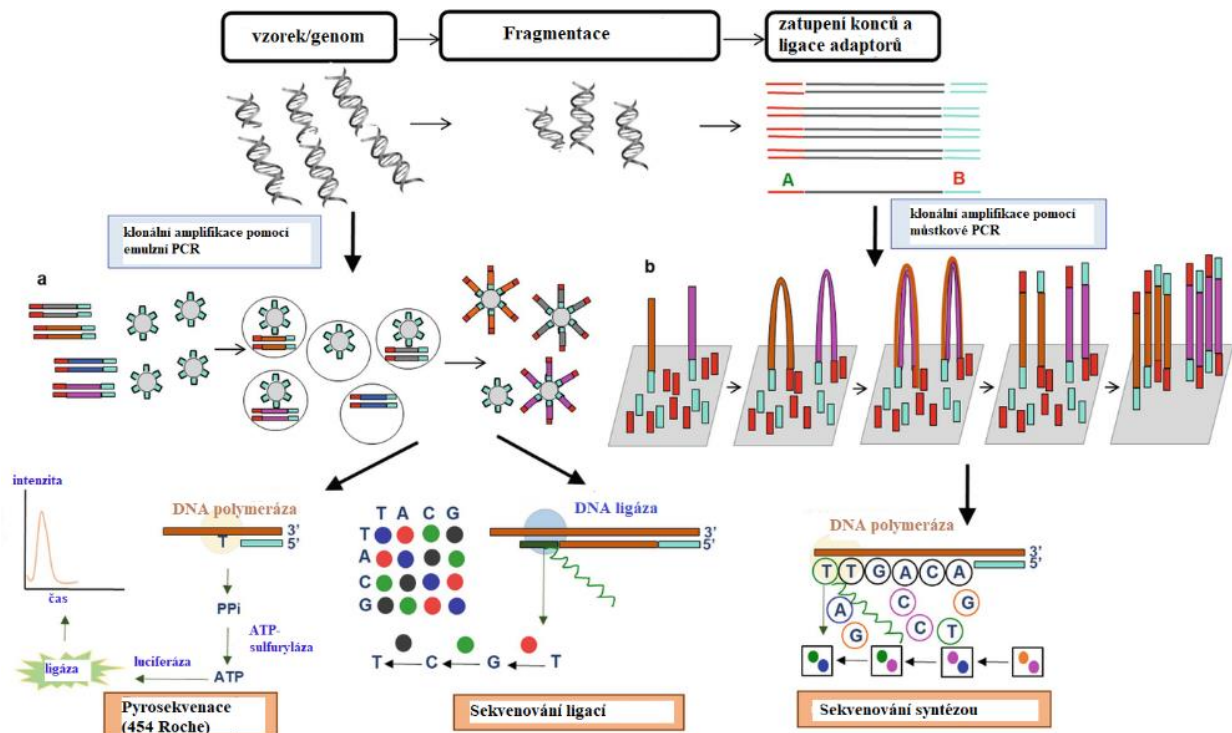
3.4 Masivně paralelní sekvenování

Sekvenování nukleových kyselin je metoda, která přesně stanovuje pořadí jednotlivých nukleotidů v molekule DNA nebo RNA (Sanger *et al.*, 1977).

Díky vyšší dostupnosti a snižování ceny se použití metod sekvenování exponenciálně zvyšuje. Prvním velkým projektem byl „Human Genome Project“ dokončený v roce 2003, který měl za cíl osekvenovat kompletní lidský genom. Tento projekt byl dokončen pomocí sekvenování první generace, tzv. Sangerova sekvenování a byly na něj vynaloženy 3 miliardy amerických dolarů (Grada *et* Weinbrecht, 2013).

Masivně paralelní sekvenování (z anglického Massively Parallel sequencing) je technika sekvenování DNA, která způsobila revoluci v genomickém výzkumu. Pomocí MPS lze osekvenovat celý lidský genom v poměrně krátkém čase. Pomocí bioinformatické analýzy jsou jednotlivá čtení namapována do lidského referenčního genomu. Masivně paralelní sekvenování může být použito k sekvenování celých genomů nebo pouze specifických oblastí, například kódujících oblastí (celých exomů) nebo malého počtu jednotlivých genů (Behjati *et* Tarpey, 2013).

Hlavním rozdílem mezi Sangerovým sekvenováním a MPS technikami je objem sekvenování. Zatímco Sangerovou metodou lze sekvenovat pouze jeden fragment DNA v reálném čase, při MPS technikách dochází k sekvenaci milionů fragmentů současně v jednom běhu. Vzhledem k tomu jsou tyto techniky rychlejší, účinnější a levnější a stále častěji nahrazují Sangerovo sekvenování. Platformy MPS fungují na různých principech (viz Obrázek č. 7), ale všechny jsou založeny na paralelní analýze (van Dijk *et al.*, 2014, Illumina, 2020).



Obrázek č. 7: Schematické znázornění základních kroků při sekvenování DNA pomocí různých MPS platform (upraveno dle Gupta *et Verma*, 2019).

Platforma Illumina je založena na principu sekvenování syntézou. Využívá speciálních adaptorů ligovaných na oba konce fragmentů. Dochází zde k tzv. můstkové amplifikaci v průtokových komůrkách s oligonukleotidy, které jsou ukotveny na dně těchto komůrek a jsou komplementární k adaptorům. Při této metodě dochází k syntéze komplementárních řetězců k fragmentům ukotveným přes oligonukleotidy. K syntéze se používají fluorescenčně značené nukleotidy (4 barvy odpovídající 4 typům nukleotidů) a fluorescenční signály jsou zaznamenány pomocí zařízení s vázanými náboji (z anglického Charge-Coupled Device, CCD) (Bentley *et al.*, 2008; Tripathi *et al.*, 2019).

Technologie SOLiD (Sequencing by Oligo Ligation Detection) využívá k amplifikaci emulzní PCR s magnetickými kuličkami (obdobně jako u pyrosekvenování) a princip je založen

na sekvenování ligací. Krátké sondy o osmi nukleotidech s navázaným fluoroforem na některých pozicích (4 barvy odpovídající 4 typům bází) jsou hybridizovány s templátem na základě komplementarity bází. Navázané sondy jsou následně spojeny ligací pomocí enzymu ligasy a fluorescence je zaznamenána kamerou. Poté jsou sondy štěpeny a pokračují další ligační cykly (Applied Biosystems, 2008).

Ion Torrent technologie využívá taktéž emulzní PCR s magnetickými kuličkami, které se vloží do jamek speciálního čipu. Do jamek se střídavě přidávají 4 typy bází a při jejich inkorporaci se uvolní proton, který způsobí změnu pH roztoku v jamce. Tato změna je detekována a převedena na signál na základě kterého jsou vyhodnoceny inkorporované báze (Rothberg *et al.*, 2011; Tripathi *et al.*, 2019).

Existují i technologie tzv. třetí generace sekvenování, u kterých nedochází k amplifikaci fragmentů, jednotlivé molekuly jsou tedy čteny v reálném čase. Tím pádem jsou tyto metody rychlejší a umožňují delší čtení. Nejvíce používanými technologiemi této generace jsou Pacific Bioscience (PacBio) a Oxford Nanopore. PacBio SMRT sekvenování (sekvenování jedné molekuly v reálném čase – Single-Molecule Real-Time sequencing) se provádí na speciálních čípech obsahujících statisíce jamek, které slouží jako vlnovody, tzv. zero mode wave-guides (ZMWs). V těchto ZMWs jsou DNA a polymerasa imobilizovány na dně. Jednotlivé molekuly DNA se připravují ligací speciálních adaptorů, které vytvoří z dsDNA cirkulární DNA. Po inkorporaci fluorescenčně značeného nukleotidu dochází k excitaci pomocí paprsku ozařujícím ZMWs zespodu a emisi světla, které je zaznamenáno pomocí CCD kamery (Eid *et al.*, 2009; Gatew *et Tarekegn*, 2018).

Oxford Nanopore technologie je založena na speciálním nanopóru, který se nachází v membráně. Je vyroben ze syntetického polymeru zalitým v iontovém roztoku. Nanopórem prochází molekula DNA tažena napětím, což generuje iontový proud. Při průchodu každého z nukleotidů dochází k charakteristickým změnám proudu, a díky tomu lze určit sekvenci molekuly DNA (Schneider *et Dekker*, 2012; Deamer *et al.*, 2016).

3.4.1 Pyrosekvenování

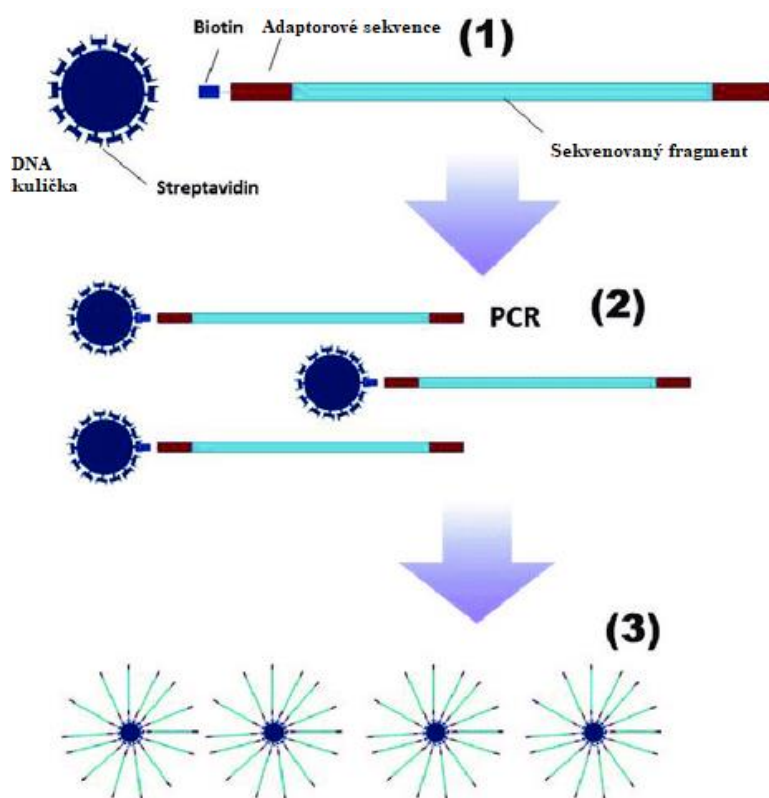
Pyrosekvenování je metoda sekvenování syntézou. Je založeno na enzymově spřažených reakcích a bioluminiscenci, která umožňuje vizualizovat uvolnění pyrofosfátu a inkorporaci nukleotidu v reálném čase (Ronaghi *et al.*, 1998).

Tato metoda může být využita pro identifikaci bodových polymorfismů (SNP), pro sekvenování krátkých sekvencí, ale také pro sekvenování celých genomů (Marguiles *et al.*, 2005).

Za rozvojem této metody stojí švédský profesor Pål Nyrén, který roku 1986 dostal nápad na alternativní metodu DNA sekvenování. Základním konceptem bylo sledování aktivity enzymu DNA polymerasy při začleňování nukleotidů do nově syntetizovaného řetězce pomocí analýzy uvolňovaného pyrofosfátu (PPi). Protože DNA polymerasa inkorporuje do nově vznikajícího řetězce nukleotid na základě komplementarity bází (guanin se spáruje vždy s cytosinem a adenin vždy s thyminem), může proto její aktivita dešifrovat složení templátové DNA při využití známých nukleotidů. Pyrofosfátová metoda stanoví, zda byl nebo nebyl nukleotid začleněn do nově vznikajícího řetězce. Úplný vývoj této metody trval téměř 10 let, jedním z hlavních důvodů byl problém s financemi (Nyrén, 2007).

Celý proces pyrosekvenování lze rozdělit do těchto fází: amplifikace cílové DNA pomocí PCR, purifikace templátu, příprava vzorku vysoce kvalitní ssDNA a samotná pyrosekvenační analýza nukleotidů (Diggle *et Clarke*, 2003).

Jako templát se pro pyrosekvenování používá PCR produkt. Před samotným pyrosekvenováním by měl být PCR produkt purifikován. Při purifikaci DNA je důležité ze směsi odstranit neinkorporované nukleotidy a PCR primery, které by mohly následnou pyrosekvenační reakci narušit. Soli přítomné v PCR reakci mohou inhibovat aktivitu enzymů a měli by být odstraněny nebo naředěny. Existují dvě strategie pro přípravu a přečištění templátové DNA, a sice příprava templátu na pevné fázi nebo enzymatická příprava templátu. U metody přípravy templátu na pevné fázi dochází k zachycení biotinylovaného DNA templátu pevným nosičem. Jako pevný nosič se využívají magnetické nebo sefárové kuličky potažené streptavidinem. Jeden z primerů je značený biotinem, takže amplikony značené biotinem jsou zachyceny streptavidinem na povrchu kuliček. Po sedimentaci jsou ostatní složky PCR reakce promytím odstraněny, čímž je získána dsDNA, která je převedena alkalickou denaturací pomocí NaOH na ssDNA (viz Obrázek č. 8). Oba typy řetězců v roztoku, biotinylované i nebiotinylované, mohou být použity jako templátová vlákna pro následnou pyrosekvenační analýzu (Fakhrai-Rad *et al.*, 2002).

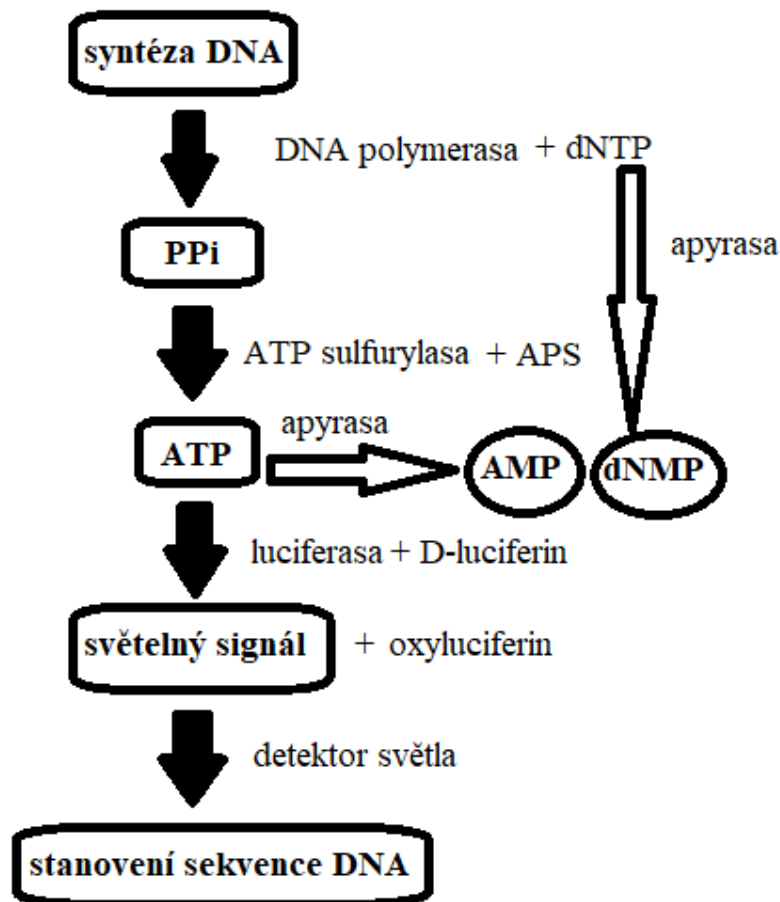


Obrázek č. 8: Izolace biotinylované DNA pomocí kuliček potažených streptavidinem (upraveno dle Shuikan et al., 2019).

Druhá metoda je enzymatická příprava templátu, která umožňuje využít dsDNA jako templát pro následnou pyrosekvenační analýzu. Tato metoda zahrnuje použití enzymu degradující nukleotidy a exonukleasu I. Tyto enzymy se přidají k PCR produktům a směs se inkubuje při pokojové teplotě nebo při 35 °C. Jako enzym degradující nukleotidy se používá alkalická fosfatasa z krevet či z telecího střeva nebo apyrasa. Enzymy degradující nukleotidy odstraní neinkorporované nukleotidy a exonukleasa I degraduje volné primery z amplifikačního kroku PCR. Poté se do směsi přidají sekvenační primery a zvýšením teploty se inaktivují enzymy použité k přečištění templátu. Poté se směs prudce ochladí, čímž se vytvoří komplex templát–primer. Existují dva enzymatické komplexy pro přípravu templátu touto metodou, a sice použití alkalické fosfatasy s exonukleasou I, který připraví templát za 20 minut. Za 3 minuty je templát připraven pomocí kombinace malého množství apyrasy, anorganického PPi a exonukleasy I (Ronaghi, 2001).

Samotná pyrosekvenační analýza je založena na využití čtyř enzymů, a sice Klenowova fragmentu DNA polymerasy I, ATP sulfurylasy, luciferasy a apyrasy (viz Obrázek č. 9). Klenowův fragment se získává proteolytickým štěpením 109 kDa nativní polymerasy

pocházející z bakterie *Escherichia coli*. ATP sulfurylasa je získávána klonováním z genu *MET3* kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, byla však nalezena i v řadě dalších organismů, jako je špenát nebo krysa. Luciferasa pochází ze světlušky *Photinus pyralis* a produkuje světlo v zelenožluté oblasti. Apyrasa je enzym závislý na Ca^{2+} a Mg^{2+} a hraje důležitou roli v různých biologických procesech (kontrola hladiny cukru v krvi, regulace imunitní odpovědi atd.). Byla popsána v mnoha organismech, ale komerční apyrasa je získávána z hlíz brambor *Solanum tuberosum*. Reakční směs také obsahuje adenosinfosulfát (APS), D-luciferin a templátovou ssDNA se sekvenčními primery. Nejprve dochází k hybridizaci sekvenčních primerů s templátovou ssDNA. Poté je komplex templát–primer inkubován s uvedenými enzymy a substráty. Následně se do reakční směsi přidá jeden ze čtyř druhů deoxynukleotidtrifosfátů (dNTP), a sice deoxyadenosintrifosfát (dATP), deoxythymidintrifosfát (dTTP), deoxycytidintrifosfát (dCTP) nebo deoxyguanosintrifosfát (dGTP). První z enzymatických reakcí je DNA polymerace, kdy se daný dNTP začlení do nově vznikajícího DNA řetězce. Začleněný nukleotid vytvoří komplementární pár s nukleotidem na templátovém vlákně. Následně Klenowův fragment DNA polymerasy I uvolní anorganický PPi , který slouží jako substrát pro ATP sulfurylasu (uvolněný PPi je ekvimolární k množství začleněného dNTP). ATP sulfurylasa převede PPi na adenosintrifosfát (ATP) za přítomnosti APS. Vzniklé ATP umožní konverzi D-luciferinu na oxyluciferin zprostředkovanou luciferasou. Oxyluciferin generuje světelný signál (množství světla je přímo úměrné k množství ATP). K detekci produkovaného světla slouží CCD kamera. Světlo je vytvořeno a detekováno pouze tehdy, je-li do reakční směsi přidán správný dNTP. Poslední reakcí je degradace nezačleněných nukleotidů a ATP pomocí enzymu apyrasy. Následuje přidání dalšího dNTP do reakční směsi a cyklické opakování enzymatických reakcí. Výsledkem pyrosekvenování je pyrogram a každé produkované světlo je zaznamenáno jako vrchol křivky (pík) na pyrogramu (Nourizad, 2004; Ahmadian *et al.*, 2006).



Obrázek č. 9: Obecné schéma pyrosekvence.

Jedna z nejznámějších technologií MPS, která je založena na pyrosekvenci, je technologie 454 (Roche), jež je však od roku 2016 již nepodporovaná (viz Obrázek č. 7). Tato metoda v sobě kombinuje emulzní PCR s pyrosekvencí. Nejprve je DNA izolována, fragmentována a na konce fragmentů jsou ligovány dva speciální typy adaptorů. Emulzní PCR se využívá pro klonální amplifikaci. Při emulzní PCR se vytvoří emulze vody s olejem. Ve vodné fázi se nachází veškeré komplementy pro PCR a speciální kuličky nesoucí na povrchu oligonukleotidové primery komplementární k jednomu z typů adaptorů. Druhý primer komplementární k druhému typu adaptoru je přidán do emulze. Po důkladném promíchání vody s olejem dochází k emulgaci a vytvoření milionů kapiček, ve kterých probíhá PCR amplifikace. V každé kapičce by se měla nacházet pouze jedna kulička s jedním templátem (nutná optimalizace). Po PCR amplifikaci následuje rozbití emulze, denaturace a přenesení kuliček se ssDNA do jamek mikrotitrační destičky, ve kterých probíhá pyrosekvenační analýza (Higuchi *et al.*, 2011).

3.5 Bisulfitické sekvenování

Jednou z nejlepších technik pro studium methylace DNA je bezpochyby BS-Seq, které v sobě spojuje bisulfitickou konverzi s technikami MPS. Celogenomové bisulfitické sekvenování (WGBS) slouží k detekci methylace DNA v celém genomu. Skládá se z kroků: přečištění a fragmentace genomové DNA, oprava konců fragmentů DNA, připojení adeninů ke 3' konci fragmentů (tzv. A-tailing), ligace methylovaných adaptérů na fragmenty, velikostní selekce fragmentů, bisulfitická konverze, PCR a sekvenování výsledné knihovny. Hlavní výhodou WGBS je jeho schopnost posoudit stav methylace téměř každého CpG místa, včetně oblastí s nízkou hustotou CpG, jako jsou intergenní „genové pouště“, částečně methylované domény a vzdálené regulační elementy. Další výhodou je možnost determinace absolutní úrovně methylace. WGBS je však velmi drahá technika. Možnost, jak snížit náklady, je využít metodu bisulfitického sekvenování se sníženým zastoupením (RRBS), která využívá fragmentaci DNA pomocí RE *MspI* necitlivé k methylaci (štěpí jak cytosiny, tak 5mC). Před samotnou bisulfitickou konverzí se pak vyberou fragmenty bohaté na CpG, které jsou dále analyzovány (výběrem fragmentů o délce 40–220 bp se pokryje 85 % všech CpG ostrůvků). RRBS se široce využívá při profilování vzorků ve velkém měřítku. Nevýhodou RRBS je nízké pokrytí vzdálených regulačních elementů a intergenních oblastí; v takovém případě je vhodnější WGBS metoda (Yong *et al.*, 2016; Rauluseviciute *et al.*, 2019;).

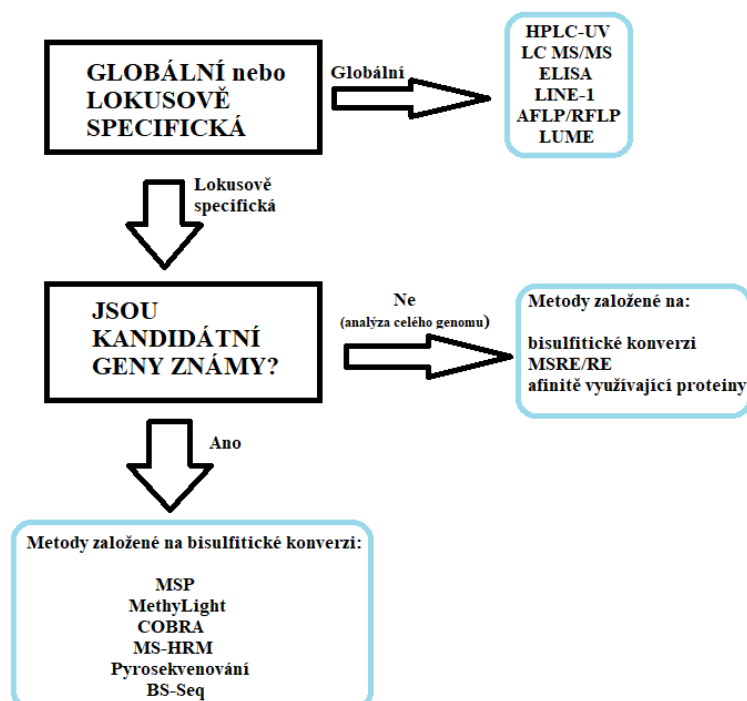
3.5.1 Bisulfitické pyrosekvenování

Jak už bylo zmíněno, metoda bisulfitické pyrosekvenace v sobě spojuje techniku bisulfitické konverze s pyrosekvenováním. Nejprve je DNA konvertována pomocí hydrogensířičitanu sodného a následně je oblast zájmu amplifikována pomocí PCR. Inkorporací biotinylovaného PCR primeru je umožněna separace dsDNA za vzniku templátové ssDNA. Pyrosekvenační primery hybridizují s touto ssDNA, což vede k následné syntéze řetězce. Pyrosekvenování je metoda pro analýzu sekvencí DNA o maximální délce 115 bp. PCR amplikony pro pyrosekvenování by měly mít délku 150–250 bp. Vytvořený signál je úměrný množství uvolněného pyrofosfátu, proto lze detekovat a kvantifikovat procento nekonvertovaných cytosinů a převedených thyminů v každém CpG místě. Výhodou této metody je zavedení vnitřní kontroly (sekvence DNA obsahuje kontrolu pro nekonvertované cytosiny) a umožnění přesné kvantifikace více CpG methylačních míst v amplikonu ve stejné reakci. Jedinou významnou nevýhodou je, že v každé reakci lze sekvenovat pouze krátké

fragmenty, což limituje počet CpG míst, které mohou být hodnoceny. Bisulfitické pyrosekvenování nabízí víceúčelovou platformu poskytující kvantitativní výsledky v krátkém čase bez technických potíží a vysokých nákladů. Tuto metodu lze využít i pro profilování methylace celého genomu (Shen *et al.*, 2007; Bassil *et al.*, 2013; Delaney *et al.*, 2015).

3.6 Další metody analýzy methylace DNA

V dnešní době existuje mnoho metod pro stanovení methylace DNA. Výběr nejvhodnější metody pro konkrétní vzorek závisí na více faktorech: cíl studie (objev epigenetických změn *de novo* nebo výzkum methylačních míst konkrétních sledovaných genů), množství a kvalita DNA, požadavky studie na citlivost a specifčnost, robustnost a jednoduchost metody, dostupnost bioinformatického software pro analýzu a interpretaci dat, dostupnost specializovaného vybavení a činidel, cena. Existující metody můžeme rozdělit do jedné z následujících kategorií: (I.) celkové změny methylace genomu (pro objev neznámých epigenetických změn) nebo (II.) hodnocení methylace DNA v konkrétních sledovaných regulačních oblastech či genech (viz Obrázek č. 10) (Kurdyukov *et al.*, 2016).



Obrázek č. 10: Přehled metod analýzy methylace DNA.

3.6.1 Analýza methylace genomu na globální úrovni

Jako zlatý standard pro kvantifikaci množství cytosinu a 5mC přítomných v hydrolyzovaném vzorku DNA je považována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí (HPLC-UV). DNA je nejprve hydrolyzována na jednotlivé báze, 5mC a cytosiny jsou chromatograficky separovány a dané frakce změřeny. Pro každý vzorek lze vypočítat poměr 5mC a cytosinů, který může být porovnán s experimentálními a kontrolními vzorky. Nevýhodou této metody je potřeba specializovaného vybavení a požadavek velkého množství vysoce kvalitního vzorku (3–10 µg). Kapalinová chromatografie spřažená s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC MS/MS) je alternativou k HPLC-UV vyžadující mnohem menší množství vzorku. Další výhodou je, že lze využít i méně kvalitní DNA pro analýzu. Potřebné vybavení a znalosti ale nejsou rozšířené, proto je tato metoda málo využívaná (Kuo *et al.*, 1980; Song *et al.*, 2005).

Metody založené na ELISA (z anglického enzyme-linked immunosorbent assay) jsou rychlé a jednoduché, ale vhodné pouze pro hrubý odhad methylace kvůli vysoké variabilitě. DNA se zachytí na ELISA destičku a 5mC jsou stanoveny pomocí inkubace s primární protilátkou a značenou sekundární protilátkou a následně s detekčními činidly (So *et al.*, 2014; Kurdyukov *et Bullock*, 2016).

Další metodou je určení úrovně methylace u retrotranspozonů LINE-1 pomocí bisulfitické konverze a následné pyrosekvenace. I když LINE-1 obsahuje relativně málo CpG míst, velmi dobře dokumentuje změny methylace v genomu a je velmi vhodná pro lidskou DNA. Také nepotřebuje velké množství vzorku a lze ji použít na tkáň zalité v parafinu (Shen *et Waterland*, 2007; Zhu *et al.*, 2014).

Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP) a polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP) nebo jejich kombinace jsou levné a rychlé metody, které se dají použít téměř pro každý druh. Tyto metody ale s nástupem lepších modernějších technik zanikají, neboť dokážou určit jen malé procento methylace a mají mnoho technických problémů (Kurdyukov *et Bullock*, 2016).

Poslední technikou je technika LUMA (luminometric methylation assay), jež využívá dvě restriktasy s rozpoznávacím místem CCGG: *HpaII* (štěpí pouze methylovanou DNA) a *MspI* (štěpí veškerou DNA). Jako vnitřní standard používá RE *EcoRI* s odlišným rozpoznávacím místem. Při následné pyrosekvenační analýze jsou přesahy vyplněny a z poměru aktivity *HpaII/MspI* je stanovena úroveň methylace ve vzorku. Tato metoda je

vysoce specifická s nízkou variabilitou a nízkou spotřebou DNA. Vyžaduje však vysoce kvalitní DNA (Karimi *et al.*, 2006; Kurdyukov *et al.*, 2016).

Všechny zmíněné metody ale nejsou zcela spolehlivé a mají tendenci buď podhodnocovat nebo nadhodnocovat úroveň methylace. Jelikož methylační analýza genomu na globální úrovni neposkytuje žádné informace o genomových pozicích, ve kterých dochází k změnám methylace, je obtížné spojit tyto změny s funkčními výsledky (Lisanti *et al.*, 2013).

3.6.2 Hodnocení methylace DNA v konkrétních sledovaných regulačních oblastech či genech v celém genomu

Z počátku byla analýza methylace DNA omezena pouze na techniky jako je Southern blotting nebo genově specifická PCR. Dnes ale existuje mnoho sofistikovaných metod pro identifikaci methylace DNA u konkrétních genů či regulačních oblastí v celém genomu. Obecně jsou tyto metody založené na jednom z těchto principů: (I.) metody založené na bisulfitické konverzi, které jsou nejběžnějším přístupem (viz předchozí), (II.) metody založené na RE, (III.) metody založené na afinitě využívající proteiny pro frakcionaci methylované vs. nemethylované DNA (Rauluseviciute *et al.*, 2019).

3.6.2.1 Metody využívající restriční endonukleasy

U metody II. se většinou využívá methylačně citlivých restričních endonukleas (MSRE) jako jsou např.: *AciI*, *BsuI5I*, *HpaII*, *HinII*, *Hin6I*, *NarI*, jejichž aktivita je blokována 5mC, a tudíž štěpí pouze nemethylované cytosiny v rozpoznávacím místě. Po následné PCR amplifikaci tedy pouze neštěpená methylovaná DNA vede k detekovatelným produktům. Opačná metoda je využití RE jako např.: *FspEI*, *GlaI*, *McrBc*, *SgeI* atd., které štěpí pouze 5mC v rozpoznávacím místě. Následně může být amplifikována pouze nemethylovaná DNA, čehož může být využito např. pro analýzu hypomethylovaných cílů u nemocných pacientů (Hofner *et al.*, 2020).

Od nástupu metody BS-Seq je využití metod založených na MSRE a RE méně časté s výjimkou využití v oblasti nádorové epigenetiky. Hlavní nevýhodou těchto metod je nutnost přítomnosti daného rozpoznávacího místa pro MSRE/RE v analyzovaném genu. Jednou z těchto metod je spojení MSRE s kvantitativní PCR (qPCR). Metoda MSRE-qPCR využívá kombinaci více MSRE pro štěpení DNA a vyžaduje alespoň 3 rozpoznávací místa. V dalším

kroku jsou produkty amplifikovány pomocí qPCR, která kromě detekce produktů poskytuje kvantifikaci methylace sledovaných oblastí. Pro stanovení absolutního a relativního množství methylace ve zkoumaných oblastech genomu se využívá kalibrační křivka (Beikircher *et al.*, 2017).

Metoda MS-MLPA (z anglického methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification) je technika, která využívá MSRE *HhaI* s rozpoznávacím místem GCGC v sondě. Sondy pro MS-MLPA jsou konstruovány tak, aby cílily pouze na jeden CpG dinukleotid v rámci jednoho CpG ostrůvku. Sondy se skládají ze dvou částí, které jsou po navázání na cílovou sekvenci blízko sebe spojeny ligací. Jedna z reakcí se provádí v přítomnosti *HhaI* a ligasy a informuje nás o úrovni methylace DNA. Druhá reakce se provádí pouze s ligasou bez *HhaI* a informuje nás o počtu kopií DNA. V případě nemethylovaného rozpoznávacího místa *HhaI* rozštěpí hybrid DNA-sonda a nevznikne tak žádný PCR produkt. Pokud je cílová DNA methylovaná, *HhaI* není schopen hybrid rozštěpit a fragment bude během následné PCR amplifikován. Procento methylace je následně vypočteno z porovnání MS-MLPA schémat píků u reakcí ošetřených a neošetřených *HhaI*. Výhodou této metody je, že není potřeba bisulfitické konverze, která vyžaduje často složitou standardizaci (Moelans *et al.*, 2017).

3.6.2.2 Metody založené na afinitních mikročipech

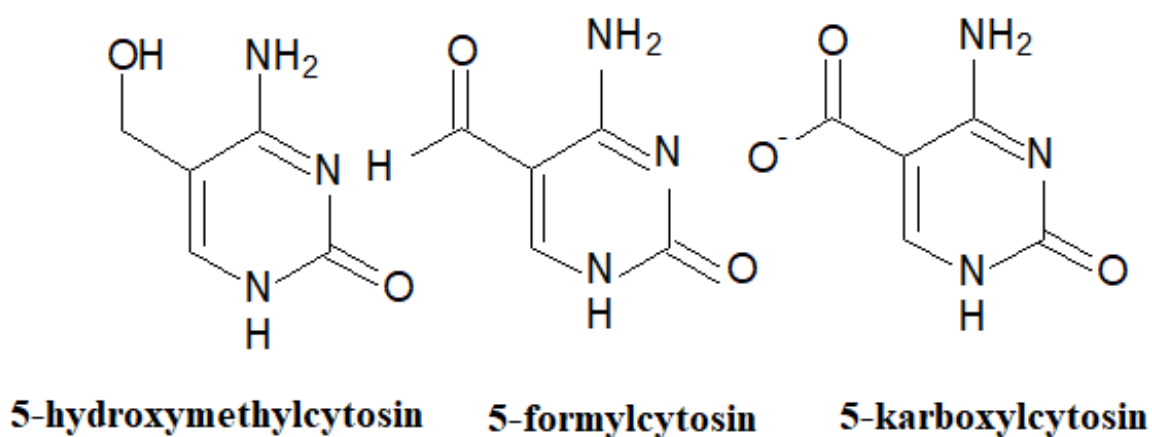
Výhodou metod založených na afinitních mikročipech je schopnost monitorovat mnoho genetických lokusů najednou. Nevýhodou je časově náročná příprava a absence spolehlivé kvantifikace. Prvním krokem je rozdělení fragmentované DNA na dvě části. Jedna část slouží jako referenční, druhá je obohacena o methylované sekvence. Při metodě imunoprecipitace methylované DNA (MeDIP) je methylovaná sekvence vysrážena pomocí monoklonální protilátky vytvořené proti 5mC a po následné extrakci označena fluorescenčním barvivem, zatímco referenční DNA je označena jiným fluorescenčním barvivem. Oba vzorky jsou poté denaturovány a hybridizovány na mikročip. Srovnáním relativních intenzit fluorescence obou fluorescenčních barev v každé pozici mikročipu lze semikvantitativně určit stupeň methylace mnoha lokusů. Podobnou technikou je technika MIRA (methylated CpG-island recovery assay) využívající MBP, které se specificky vážou na symetricky methylované CpG motivy. Komplex methylované DNA–MBP je pak zachycen na pevný nosič v afinitní koloně. Po zachycení je DNA eluována z komplexu DNA–MBP a amplifikována pomocí PCR nebo zpracována

a hybridizována na mikročip spolu s neobohacenou DNA jako u metody MeDIP (Yu *et al.*, 2010).

3.6.3 Metody pro stanovení 5-hydroxymethylcytosinu

Oxidací 5mC za katalýzy proteiny TET vzniká 5hmC. Problémem většiny metod detekujících methylaci DNA je nemožnost rozlišit 5mC od 5hmC. Při bisulfitické konverzi jsou jak 5mC, tak 5hmC rezistentní vůči hydrogensířičitanu sodnému a nepřevedeny na uracil. Byly vytvořeny různé techniky k odlišení 5mC od 5hmC. Jednou z nich je oxidativní BS-Seq, která je založena na oxidaci 5hmC na 5-formylcytosin (5fC) nebo 5-karboxylcytosin (5caC) (viz Obrázek č. 11) pomocí ruthenistanu draselného (KRuO₄). 5fC a 5caC je možné konvertovat na uracil stejně jako nemetylované cytosiny. Vylepšená technika oxidativní BS-Seq je technika TAB-Seq (TET-assisted bisulfite sequencing), při které jsou 5hmC chráněny glukózovou skupinou před působením TET. Nechráněné 5mC jsou poté pomocí TET oxidovány na 5fC nebo 5caC a převedeny na uracil. 5hmC jsou tak jediná rezidua, která jsou sekvenována jako cytosiny (Yu *et al.*, 2012).

Dalším způsobem je působení enzymu glukosyltransferasy, který modifikuje 5hmC, ale na 5mC nepůsobí. Modifikované 5hmC jsou pak rezistentní vůči štěpení pomocí RE *MspI*. Štěpená DNA je následně analyzována pomocí MPS nebo qPCR. Další možností je využití protilátek vůči 5hmC (Kurdyukov et Bullock, 2016).



Obrázek č. 11: Strukturální vzorce 5-hydroxymethylcytosinu, 5-formylcytosinu a 5-karboxylcytosinu (vytvořeno v programu Chemscketch).

3.7. Bisulfitická pyrosekvenence pomocí PyroMark Q48 Autoprep

Německá biotechnologická firma QIAGEN vyvinula technologii pro determinaci věku jedinců na základě polského výzkumu, která využívá právě metody bisulfitické pyrosekvenace. Polský tým analyzoval 41 CpG míst z 8 kandidátních lokusů (vybrány na základě Hannum *et al.*, 2013), a sice *ELOVL2*, *C1orf132*, *KLF14*, *SLC6A4*, *F5*, *CCDC102B*, *TRIM59* a *FHL2* pomocí bisulfitické pyrosekvenace. Cílem bylo nalézt CpG místa, jejichž úroveň methylace vykazovala co největší korelaci s věkem. Pro usnadnění technické stránky měl být vyselektován co nejnižší počet co nejinformativnějších CpG míst. Na základě testování 420 vzorků DNA od jedinců obou pohlaví ve věku 2–75 let byly vybrány následující CpG místa: CpG7 u *ELOVL2*, CpG1 u *C1orf132*, CpG7 u *TRIM59*, CpG1 u *KLF14* a CpG2 u *FHL2* (Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015),

Pyrosekvenátor PyroMark Q48 Autoprep analyzuje bisulfiticky konvertovanou DNA po PCR amplifikaci. Tato metoda, kterou využívám ve své diplomové práci, má mnoho výhod: kvantifikace methylace v konkrétní sekvenci; měření úrovně methylace v individuálních i mnohonásobných CpG místech i mimo ně; vhodnost pro stanovení mutací a SNP; vysoká citlivost analýzy; malé množství vstupního vzorku (1–10 ng DNA); plně automatizovaný protokol; vysoká rychlost a propustnost (analýza až 48 PCR produktů, tedy 8 vzorků a 1 kontrolního vzorku v jednom běhu, více běhů v jednom dni, výsledky do několika hodin); zavedení vnitřních kontrol k potvrzení úplnosti bisulfitické konverze; snadný postup a použití. Na rozdíl od předchozích pyrosekvenátorů PyroMark Q48 má vyšší propustnost a také větší přesnost a délku čtení. Navíc zavedení disku jako nosiče pro templátovou DNA (předešlé pyrosekvenátory využívaly jako nosič pro vzorky desku) zabraňuje křížové kontaminaci mezi jamkami v jednom běhu nebo i navzájem mezi disky ve více bězích (viz Obrázek 17A v části 4.3.4 Genotypizace pomocí pyrosekvenování) (QIAGEN, 2021).

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Jako biologický materiál byla k analýze použita vyzolovaná DNA ze vzorků periferní krve. Vzorky periferní krve byly získány na základě informovaného souhlasu od českých dárců krve ve věku 20–63 let v letech 2018–2019 a 2021 z Fakultní nemocnice v Olomouci. Do analýzy byly uchovávány při teplotě -20 °C.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

- ❖ EpiTect Control DNA, methylated (100) (QIAGEN, kat. č. 59655)
- ❖ EpiTect Control DNA, unmethylated (100) (QIAGEN, kat. č. 59665)
- ❖ EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (50) (QIAGEN, kat. č. 59824)
- ❖ PyroMark PCR Kit (200) (QIAGEN, kat. č. 978703)
- ❖ PyroMark Q48 Advanced CpG Reagents (4 x 48) (QIAGEN, kat. č. 974022)
- ❖ PyroMark Q48 Magnetic Beads (300) (QIAGEN, kat. č. 974203)
- ❖ Ethanol absolutní (Penta, kat. č. 71250–11001)
- ❖ Deionizovaná voda
- ❖ Forward a reverse primery pro geny *ELOVL2*, *C1orf132*, *TRIM59*, *KLF14* a *FHL2* (Generi Biotech)
- ❖ Sekvenační primery pro geny *ELOVL2*, *C1orf132*, *TRIM59*, *KLF14* a *FHL2* (Generi Biotech)

Pozn. sekvence použitých forward, reverse a sekvenačních primerů jsou uvedeny v kapitole Přílohy jako Příloha č. 1.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- ❖ Vortex mixér VX-200 (Labnet International)
- ❖ Vortex mixér PV-1 (Grant-bio)
- ❖ Centrifuga MiniSpin (Eppendorf)
- ❖ Centrifuga 5430 (Eppendorf)
- ❖ Centrifuga/vortex Combi-Spin (Biosan)

- ❖ Centrifuga GmCLab (Gilson)
- ❖ Laminární box Mars Safety Class 2 (LaboGene)
- ❖ Mrazák a chladnička (Gorenje)
- ❖ Spektrofotometr NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)
- ❖ Termocyklér Mastercycler Nexus (Eppendorf)
- ❖ Termocyklér Real-Time PCR Detection System CFX96 C1000 Touch (Bio-Rad)
- ❖ QIAcube (QIAGEN)
- ❖ QIAcube Starter Pack (QIAGEN, kat. č. 990395)
- ❖ Termoblok ThermoStat Plus Thermomixer (Eppendorf)PyroMark Q48 Autoprep (QIAGEN)
- ❖ PyroMark Q48 Discs (50) (QIAGEN, kat. č. 974901)
- ❖ PyroMark Q48 Absorber Strips (100) (QIAGEN, kat. č. 974912)

4.3 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

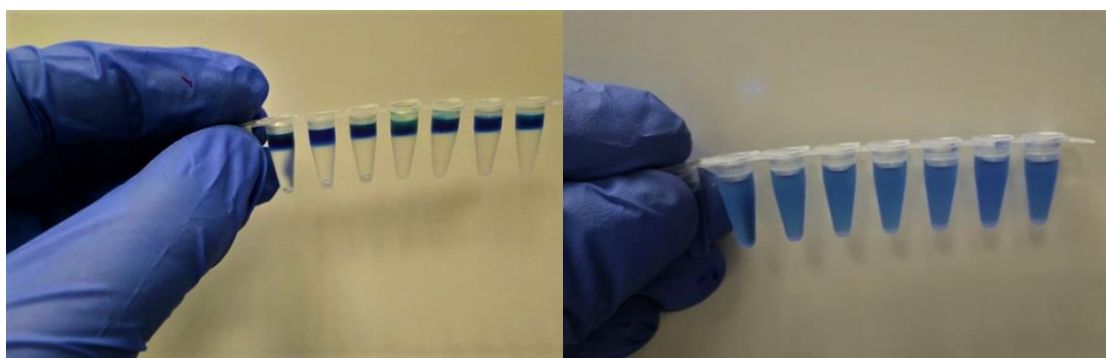
4.3.1 Bisulfitická konverze

1. Nejprve byly rozmrazeny vzorky s vyizolovanou DNA z krve.
2. Následně byla spektrofotometricky stanovena koncentrace DNA pomocí Nanodropu. Koncentrace DNA musí být minimálně $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a poměr absorbancí 260 nm/ 280 nm by měl být $\sim 1,8$.
3. Ve 100 μl 8-zkumavkovém stripu byly připraveny bisulfitické reakce za pomoci EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit dle Tabulky č. 1. Většinou bylo připraveno 12 reakcí současně ve 2 stripech.

Tabulka č. 1: Jednotlivé komponenty pro bisulfitickou konverzi a jejich objemy pro 1 reakci.

komponenty	objem pro 1 reakci
DNA	variabilní, závislé na koncentraci DNA (dohromady 20 μl)
ddH ₂ O	
bisulfitiční roztok	85 μl
DNA ochranný pufr	35 μl
konečný objem	140 μl

4. DNA byla naředěna na koncentraci $200 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ pomocí ddH₂O do finálního objemu 20 μl (např. při koncentraci DNA $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ byly použity 2 μl DNA a 18 μl ddH₂O).
5. Následně bylo k naředěné DNA přidáno 85 μl bisulfitačního roztoku a uzavřené stripy s komponenty byly zvortexovány.
6. Poté bylo opatrně na povrch směsi naneseo 35 μl DNA ochranného pufru. Došlo k vytvoření modrého prstence na povrchu, který značí správné pH pro bisulfitickou konverzi (viz Obrázek č. 12A).
7. Uzavřené stripy byly posléze zvortexovány a centrifugovány. Došlo k rovnoměrnému zabarvení roztoku na modro, což značí dostatečné promísení vzorku (viz Obrázek č. 12B).



A

B

Obrázek č. 12 A, B: Stripy s bisulfitickou reakcí po přidání DNA ochranného pufru před promícháním (A) a po promíchání (B).

8. Následně byly stripy s bisulfitickými reakcemi umístěny do termocykléru, ve kterém probíhala bisulfitická konverze (viz Tabulka č. 2).

Tabulka č. 2: Protokol bisulfitické konverze.

proces	teplota	čas
denaturace	95 °C	5 min
inkubace	60 °C	20 min
denaturace	95 °C	5 min
inkubace	60 °C	20 min
inkubace	20 °C	nedefinováno

4.3.2 Purifikace DNA

Po bisulfitické konverzi bylo nutné odstranit veškeré nežádoucí kontaminanty ze vzorků. Přečištění DNA mohlo být provedeno pomocí automatického izolátoru QIAcube od firmy QIAGEN (maximální počet vzorků, které mohou být v jednom běhu přečištěny, je 12) nebo manuálně.

4.3.2.1 Purifikace pomocí QIAcube

1. Nejprve byly doplněny 200 µl a 1000 µl špičky s filtry do úplného zaplnění zásobníků QIAcube.
2. Byly připraveny potřebné chemikálie, a sice nanášecí pufr (BL–Loading Buffer), promývací pufr (BW–Wash Buffer), desulfonační pufr (BD–Desulfonation Buffer), eluční pufr (EB–Elution Buffer) a absolutní ethanol. BW pufr byl připraven přidáním 30 ml absolutního ethanolu do zásobního roztoku. BD pufr byl připraven přidáním 27 ml absolutního ethanolu do zásobního roztoku. Všechny reagenty byly vloženy do stojanu na reagenční láhve v QIAcube dle Tabulky č. 3.

Tabulka č. 3: Rozmístění reagentů v QIAcube.

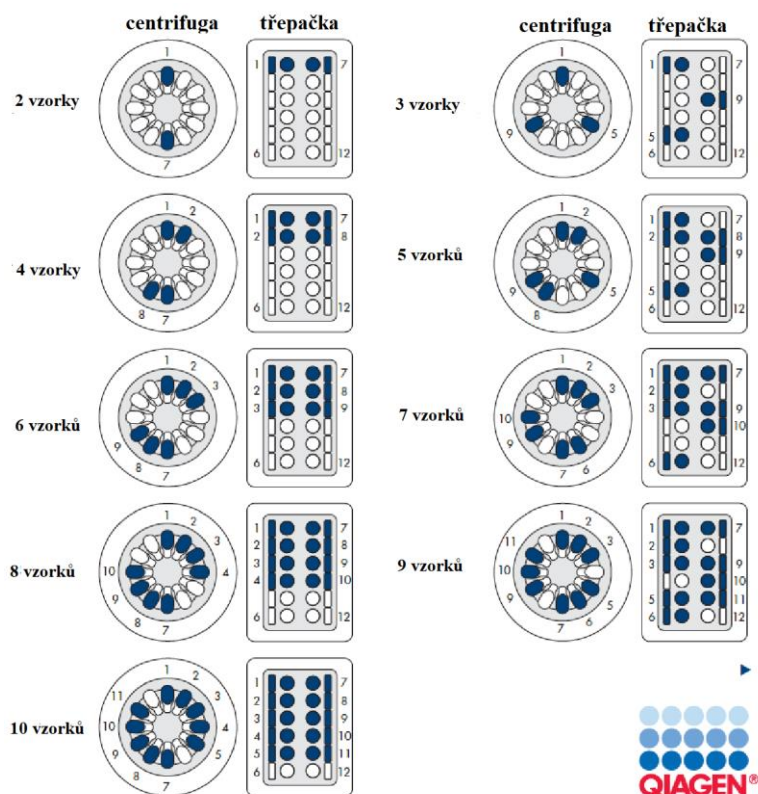
1. BL pufr	2. BW pufr
3. BD pufr	4. EB pufr
5. ethanol	6. x

3. Do každého adaptéru pro rotor byla umístěna jedna kolonka MinElute DNA Spin Column a jedna sběrná 1,5 ml mikrozkušavka, která slouží pro zachycení DNA (viz Obrázek č. 13). Dle počtu vzorků pro purifikaci byly adaptéry specificky umístěny do centrifugy QIAcube (viz Obrázek č. 14).



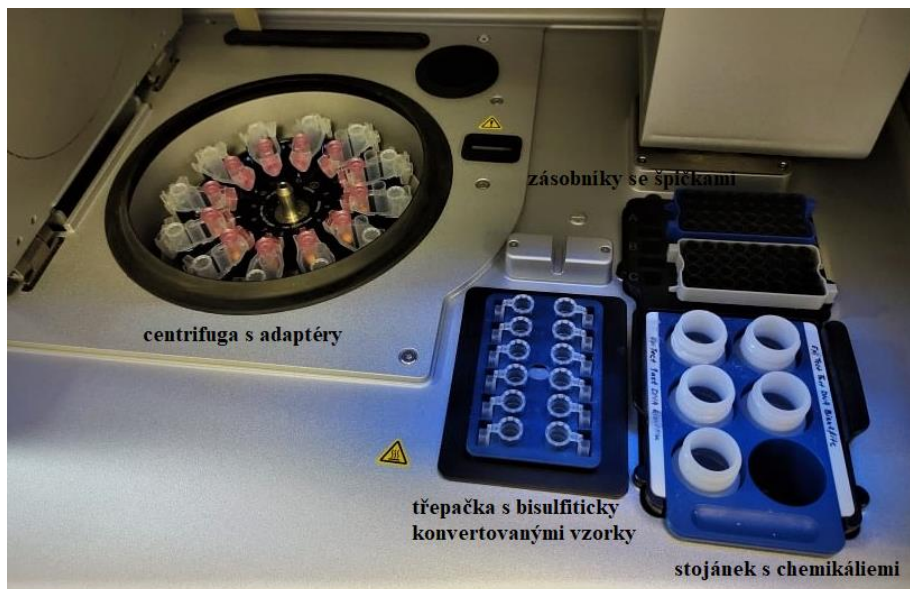
Obrázek č. 13: Připravený adaptér pro rotor u QIAcube.

4. Stripy s bisulfiticky konvertovanými vzorky byly zcentrifugovány a následně byl veškerý objem (140 μ l) přepipetován do 2 ml mikrocentrifugačních zkumavek s bezpečným uzávěrem, tzv. RB zkumavek.
5. RB zkumavky se vzorky byly dle jejich počtu specificky umístěny do adaptéru pro třepačku pro 2 ml RB zkumavky (označen číslem 2) a následně vloženy do třepačky QIAcube (viz Obrázek č. 14).



Obrázek č. 14: Rozmístění vzorků dle jejich počtu ve třepačce a centrifuze u QIAcube (upraveno dle QIAGEN).

6. Pro purifikaci byl použit protokol pro přečištění „EpiTect Fast DNA Bisulfite“ – konvertovaná DNA – až do 100 ng DNA. Po nachystání všech komponent (viz Obrázek č. 15) byla purifikace zahájena, pro 12 vzorků trvala kolem 72 minut.



Obrázek č. 15: QIAcube připravený pro purifikaci DNA.

4.3.2.2 Manuální přečištění DNA

1. Po dokončení bisulfidické konverze byly stripy s reakcemi krátce zcentrifugovány a jejich celý obsah (140 μ l) byl přenesen do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek.
2. Do každého vzorku bylo napipetováno 310 μ l BL pufru. Vzorky byly následně zvortexovány a krátce zcentrifugovány.
3. Následně bylo napipetováno 250 μ l absolutního ethanolu do každého vzorku. Vzorky byly následně zvortexovány po dobu 15 sekund a krátce zcentrifugovány.
4. Celý objem vzorků (700 μ l) byl přenesen do odpovídajícího počtu kolonek MinElute DNA Spin Columns, které byly umístěny v odpovídajícím počtu 2 ml sběrných zkumavek. Kolonky byly následně centrifugovány při 12 100 g po dobu 1 minuty.
5. Po odstranění vodné fáze bylo napipetováno 500 μ l BW pufru do každé kolonky a kolonky byly zcentrifugovány při 12 100 g po dobu 1 minuty.

6. Po odstranění vodné fáze bylo napipetováno 500 μl BD pufru do každé kolonky a následně byly kolonky inkubovány 15 minut při pokojové teplotě (15–25 °C) se zavřeným víčkem (důležité, aby nedošlo k okyselení BD pufru oxidem uhličitým).
7. Po inkubaci byly kolonky zcentrifugovány při 12 100 g po dobu 1 minuty.
8. Po odstranění vodné fáze bylo napipetováno 500 μl BW pufru do každé kolonky a kolonky byly zcentrifugovány při 12 100 g po dobu 1 minuty. Tento krok byl proveden 2x.
9. Po odstranění vodné fáze bylo napipetováno 250 μl absolutního ethanolu do každé kolonky a kolonky byly zcentrifugovány při 12 100 g po dobu 1 minuty.
10. Následně byly kolonky umístěny do nových 2 ml odběrových zkumavek a zcentrifugovány při 12 100 g po dobu 1 minuty pro odstranění veškeré zbytkové kapaliny.
11. Kolonky byly přemístěny do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a inkubovány s otevřenými víčky po dobu 5 minut při 60 °C v termobloku pro odpaření veškeré zbývající kapaliny.
12. Kolonky byly přemístěny do nových sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek. Do středu každé membrány u každé kolonky bylo napipetováno 15 μl EB pufru a kolonky byly inkubovány 1 minutu při pokojové teplotě.
13. Nakonec byly kolonky centrifugovány po dobu 1 minuty při 12 100 g, čímž došlo k eluci DNA.

4.3.3 PCR amplifikace

1. PCR amplifikace byla provedena v pěti 1,5 ml mikrozkumavkách pro každý z pěti CpG lokusů (*ELOVL2*, *C1orf132*, *TRIM59*, *KLF14* a *FHL2*) zvlášť. Reakční směs byla připravena dle Tabulek č. 4–8. Většinou bylo amplifikováno 12 vzorků DNA zároveň. Kvůli možné nepřesnosti v pipetování se připravovala reakční směs pro 13 vzorků.

Tabulka č. 4: Objem a koncentrace chemikálií pro PCR amplifikaci genu *ELOVL2*.

chemikálie	objem pro 1 reakci	objem pro 13 reakcí	finální koncentrace
Pyromark PCR Master Mix 2x	12,5 μl	162,5 μl	pufr 1x
forward <i>ELOVL2</i> primer	1,5 μl	19,5 μl	0,8 μM
reverse <i>ELOVL2</i> primer	1,5 μl	19,5 μl	0,8 μM
voda v PCR kvalitě	6 μl	78 μl	
finální objem	21,5 μl	279,5 μl	

Tabulka č. 5: Objem a koncentrace chemikálií pro PCR amplifikaci genu *C1orf132*.

chemikálie	objem pro 1 reakci	objem pro 13 reakcí	finální koncentrace
Pyromark PCR Master Mix 2x	12,5 µl	162,5 µl	pufr 1x
forward <i>C1orf132</i> primer	2 µl	26 µl	0,2 µM
reverse <i>C1orf132</i> primer	2 µl	26 µl	0,2 µM
voda v PCR kvalitě	5 µl	65 µl	
finální objem	21,5 µl	279,5 µl	

Tabulka č. 6: Objem a koncentrace chemikálií pro PCR amplifikaci genu *TRIM59*.

chemikálie	objem pro 1 reakci	objem pro 13 reakcí	finální koncentrace
Pyromark PCR Master Mix 2x	12,5 µl	162,5 µl	pufr 1x
forward <i>TRIM59</i> primer	0,75 µl	9,75 µl	0,3 µM
reverse <i>TRIM59</i> primer	0,75 µl	9,75 µl	0,3 µM
voda v PCR kvalitě	7,5 µl	97,5 µl	
finální objem	21,5 µl	279,5 µl	

Tabulka č. 7: Objem a koncentrace chemikálií pro PCR amplifikaci genu *KLFI4*.

chemikálie	objem pro 1 reakci	objem pro 13 reakcí	finální koncentrace
Pyromark PCR Master Mix 2x	12,5 µl	162,5 µl	pufr 1x
forward <i>KLFI4</i> primer	0,5 µl	6,5 µl	0,6 µM
reverse <i>KLFI4</i> primer	0,5 µl	6,5 µl	0,6 µM
voda v PCR kvalitě	8 µl	104 µl	
finální objem	21,5 µl	279,5 µl	

Tabulka č. 8: Objem a koncentrace chemikálií pro PCR amplifikaci genu *FHL2*.

chemikálie	objem pro 1 reakci	objem pro 13 reakcí	finální koncentrace
Pyromark PCR Master Mix 2x	12,5 µl	162,5 µl	pufr 1x
forward <i>FHL2</i> primer	0,5 µl	6,5 µl	0,6 µM
reverse <i>FHL2</i> primer	0,5 µl	6,5 µl	0,6 µM
voda v PCR kvalitě	8 µl	104 µl	
finální objem	21,5 µl	279,5 µl	

Pozn. Pyromark PCR Master Mix 2x obsahuje Hot Start Taq DNA Polymerasu, PyroMark PCR pufr a dNTPs.

2. Připravené reakční směsi byli zvortexovány, zcentrifugovány a rozpipetovány do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky.
3. Do každé jamky byl přidán 1 µl příslušné bisulfiticky konvertované přečištěné DNA.

4. Po zalepení destičky fólií, zvortexování a centrifugaci byla destička vložena do termocykléru a byla provedena PCR amplifikace dle Tabulky č. 9.

Tabulka č. 9: Protokol PCR amplifikace.

proces	čas	teplota	počet cyklů
počáteční aktivace PCR (pro aktivaci <i>Taq</i> polymerasy)	15 min	95 °C	1
denaturace	30 s	95 °C	10
hybridizace	30 s	48 °C → 52,5 °C	
extenze	30 s	72 °C	
denaturace	30 s	95 °C	40
hybridizace	30 s	52 °C	
extenze	30 s	72 °C	
závěrečná extenze	10 min	73 °C	1
inkubace	nedefinováno	4 °C	

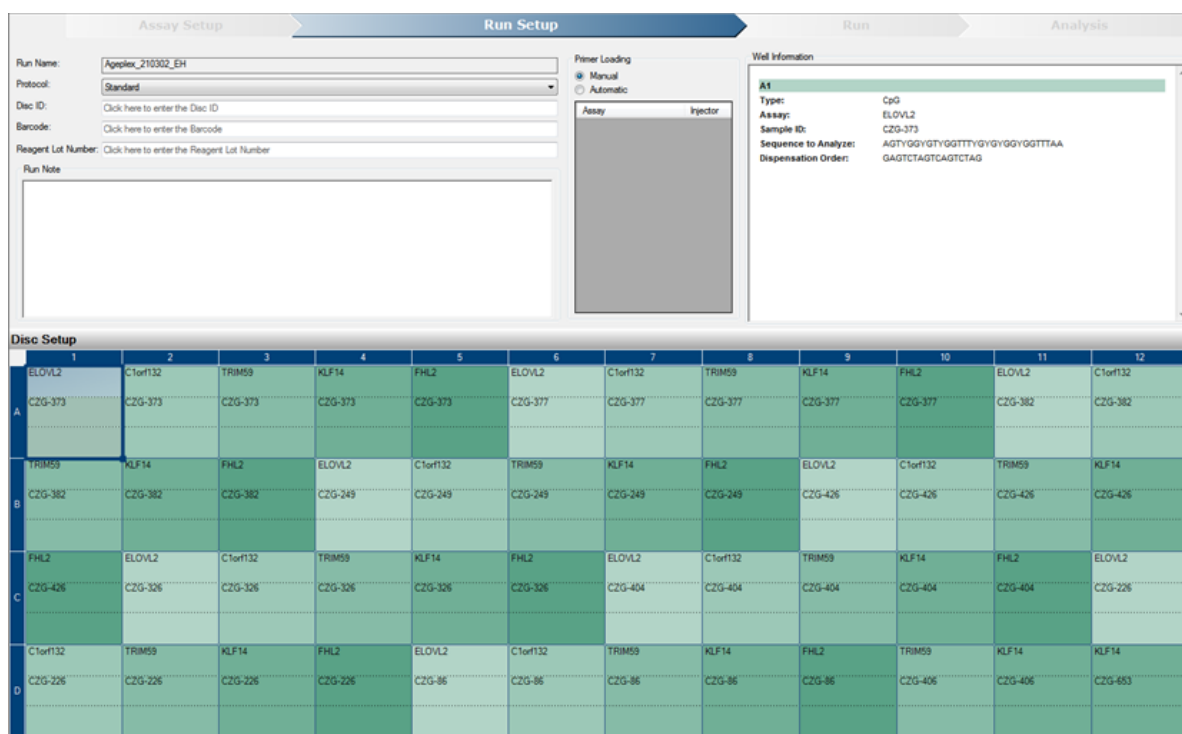
Pozn. U 1.–10. cyklu hybridizace dochází k postupnému zvyšování teploty o +0,5 °C za cyklus (48–52,5 °C). Cykly 11–50 zachovávají teplotu na 52 °C.

4.3.4 Genotypizace pomocí pyrosekvenování

1. V PyroMark Q48 Autoprep Software byl vytvořen sekvenační program (soubor nastavení běhu) dle Tabulky č. 10, který byl nahrán do pyrosekvenátoru PyroMark Q48 Autoprep. (viz Obrázek č. 16). Zároveň je možné analyzovat až 48 PCR produktů (nejčastěji bylo sekvenováno 9 vzorků o 5 PCR produktech pro každý z 5 CpG lokusů, tedy 45 PCR produktů současně).

Tabulka č. 10: Přehled sekvencí, pozic v genomu a CpG pozic u sekvenovaných genů.

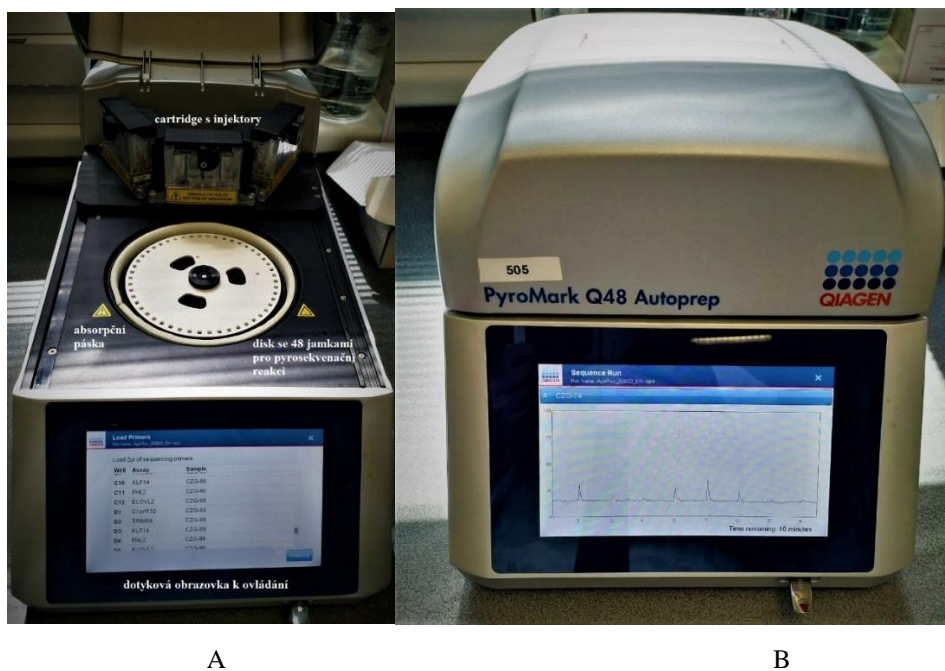
příslušný gen	sekvence		pozice v genomu	CpG pozice
<i>ELOVL2</i>	sekvence před konverzí	AGCCGGCGCCGGTTTCGCGCGGCGGCTCAA	Chr6: 11044661	CpG místo 7
	analyzovaná sekvence	GAGTCTAGTCAGTCTAG		
<i>C1orf132</i>	sekvence před konverzí	CGCCGCCTGCGCAGACCCAAATCTTGGTCC	Chr1: 207823681	CpG místo 1
	analyzovaná sekvence	GTCAGTCTGTAGTCGCTA		
<i>TRIM59</i>	sekvence před konverzí	CGTCGGCCACCGGCGC	Chr3: 160450199	CpG místo 7
	analyzovaná sekvence	GTCAGTCGCTGATCTAGTCG		
<i>KLF14</i>	sekvence před konverzí	CGCGTTCTTTCTTCTGCCGGCGAGCCAGGTA ATGGTAACAGAG	Chr7: 130734355	CpG místo 1
	analyzovaná sekvence	GTCAGTCGTTTAGTCTAGTCGAG		
<i>FHL2</i>	sekvence před konverzí	TCGGGAGCGTCGCCTCCGGCGTGGGCTCTCG GGCGCGAGTTTCGGACGAGGCCTGGG	Chr2: 105399288	CpG místo 2
	analyzovaná sekvence	GTCGATGTCAGTCAGTTCTAGTCGT		



Obrázek č. 16: Nastavení běhu pro pyrosekvenaci v PyroMark Q48 Autoprep Software.

2. Nejprve byly injektory v cartridge pyrosekvenátoru pročištěny 200 µl deionizované vody. Tento krok byl proveden 2x (do přístroje byl vložen absorpční pásek, který vstřebává tekutiny, po pročištění musel být vyměněn).
3. Následně byly do injektorů napipetovány všechny potřebné komponenty k analýze (nanášené objemy záleží na počtu analyzovaných vzorků a na počtu běhů prováděných v jeden den). Pro sekvenování 9 vzorků (45 obsazených pozic) při jednom běhu v daný den bylo do injektorů napipetováno: 80 µl dATP, 90 µl dGTP, 100 µl dTTP, 100 µl dCTP (rozdíl v objemu přidávaných dNTP je na základě charakteru analyzovaných sekvencí), 320 µl vazebného pufru (BB–Binding Buffer), 550 µl denaturačního roztoku (DS–Denaturation Solution), 310 µl substrátu, 310 µl enzymu a 2480 µl hybridizačního pufru (AB–Annealing Buffer). Roztok enzymu a substrátu byl připraven rozpuštěním jejich lyofilizovaných směsí v 660 µl AB pufru.
4. Po uzavření cartridge bylo přístrojem ověřeno, zda došlo k napipetování dostatečných objemů.
5. Následně byl do přístroje vložen pyrosekvenační disk s 48 jamkami. Nejprve byly naneseny 3 µl magnetických kuliček do daných jamek disku.
6. Poté bylo napipetováno 10 µl PCR produktů genů *ELOVL2*, *C1orf132*, *TRIM59*, *KLF14* a *FHL2* do příslušných jamek na disku (viz Obrázek č. 17A).

7. Po zahájení pyrosekvenace došlo v prvních 20 minutách k přípravě ssDNA, tento krok zahrnoval odpařování zahříváním pro snížení objemů v jamkách.
8. Po 20 minutách byly ručně přidány 2 μ l sekvenačních primerů pro dané geny do příslušných jamek s PCR produkty a kuličkami.
9. Následně byla provedena samotná pyrosekvenační analýza (viz Obrázek 17B). Doba trvání analýzy závisí na počtu analyzovaných vzorků. Pro 9 vzorků (45 pozic) je doba analýzy okolo 45 minut.



Obrázek č. 17 A, B: Pyrosekvenátor PyroMark Q48 Autoprep při přípravě na pyrosekvenaci (A) a při pyrosekvenaci (B).

10. Po dokončení analýzy byla data vyhodnocena pomocí PyroMark Q48 Autoprep Software. Výstupem analýzy byl pyrogram. Pro každý vzorek bylo vyhodnoceno procento methylace DNA u každého z pěti CpG lokusů. Kvalita získaných výsledků je znázorněna pomocí barevných proužků (modrá, žlutá a červená).
11. Odhad věku na základě procenta methylace DNA byl poté proveden pomocí kalkulatoru věku, který je volně dostupný na webu BioVectis: <http://biovectis.com/forensic1/age-calculator>.

5. VÝSLEDKY

Analýza vzorků se skládala ze tří částí:

- 1) Byly analyzovány kontrolní vzorky DNA od firmy QIAGEN, a sice plně methylovaná DNA a plně nemethylovaná DNA a směs vzniklá smícháním obou kontrol v poměru 1:1. Tyto vzorky již byly bisulfiticky konvertované, proto byly podrobeny pouze PCR amplifikaci a pyrosekvenaci (viz kapitola 5.2 Analýza kontrolní DNA).
- 2) Bylo analyzováno 15 vzorků DNA vyizolovaných z periferní krve dárců krve ve věku 20–55 let ve třech opakováních pro každý vzorek (viz kapitola 5.3 Analýza DNA z periferní krve ve třech opakování).
- 3) Bylo analyzováno 217 vzorků DNA vyizolovaných z periferní krve dárců krve ve věku 20–63 let s opakováním analýzy při špatných výsledcích vzorku (analýza opakována u 18 vzorků) (viz Příloha č. 2 a 3 a kapitola 5.4 Analýza DNA izolované z periferní krve).

První dvě části byli součástí testování nové verze kitu pro odhad věku organizované firmou QIAGEN, kterého se kromě naší laboratoře účastnily i další čtyři forenzní laboratoře z Dánska, Francie, Německa a USA.

5.1 Hodnocení analýzy pomocí PyroMark Q48 Autoprep Software a BioVectis kalkulátoru věku

Výsledky pyrosekvenační analýzy byly vyhodnoceny pomocí speciálního software PyroMark Q48 Autoprep Software. Tento software automaticky zpracovává data z pyrosekvenátoru a generuje pyrogram pro jednotlivé CpG lokusy u jednotlivých vzorků (viz Obrázek č. 18).



Obrázek č. 18: Výsledek pyrosekvence analýzy zpracovaný PyroMark Q48 Autoprep Software.

Osa X reprezentuje pořadí nukleotidů, které byly cyklicky do reakce přidávány. Osa Y vyjadřuje intenzitu signálu luminiscence v relativních luminiscenčních jednotkách (RLU) emitovaných po začlenění daného nukleotidu do sekvence. Výška jednotlivých píků je tedy přímo úměrná množství inkorporovaných nukleotidů do syntetizovaného řetězce. Sekvence v levém horním rohu pyrogramu je oblast podrobená pyrosekvenační analýze, kde písmena Y označují příslušný cytosin v každém CpG místě v sekvenci.

CpG místa jsou v pyrogramu vyobrazena jako světle modrá pole. U každého genu se stanovuje procento methylace u jednoho konkrétního CpG místa, a sice CpG místa 7 pro *ELOVL2*, CpG místa 1 pro *C1orf132*, CpG místa 7 pro *TRIM59*, CpG místa 1 pro *KLF14* a CpG místa 2 pro *FHL2*. Procenta methylace představují poměr mezi intenzitami signálu C/T v každém cytosinu daného CpG místa a jsou automaticky stanoveny software.

Světle růžová pole pak reprezentují kontroly bisulfitické konverze, ke kterým je využíván nemetylovaný cytosin. Detekce signálu není u těchto kontrol očekávaná. Případná tvorba píku v kontrole značí špatné provedení bisulfitické konverze a může vyvolat komplikaci při vyhodnocování procenta methylace daného CpG místa.

Kvalita získaných výsledků je stanovena na základě barevných proužků u každého markeru:

- modrá = „passed“ = analýza byla úspěšná, výsledek bez komplikací;
- žlutá = „check“ = výsledek s možnými komplikacemi, analýzu nutno ověřit;
možné komplikace: klesající síla signálu; signál v nukleotidovém cyklu, kde se signál neočekával; signál v kontrole bisulfitické konverze;
- červená = „failed“ = analýza byla neúspěšná, selhala;
možné komplikace: příliš slabý signál nebo nerovnoměrnost jednotlivých signálů;

Spolehlivost tohoto hodnocení není ale zcela jasná, neboť u některých vzorků byla procenta methylace stanovena i přes špatnou kvalitu výsledků (žlutá nebo červená barva proužků) a při následném odhadu věku pomocí kalkulátoru věku od BioVectis se odhadnutý věk téměř nelišil od věku skutečného. Například u vzorků 18-0962-DG-4056 (CZG 28), 18-1088-DG-4201 (CZG 105) a 18-1090-DG-4203 (CZG 107) byla kvalita výsledků vyhodnocena jako neúspěšná (červená barva) u všech 5 markerů, ale odhadnutý věk se od skutečného lišil pouze o 1 rok (viz Příloha č. 2). Marker *C1orf132* dle software vykazoval nejnižší kvalitu výsledků ze všech 5 markerů. Výsledky byly následující: analýzu 57,8 % bylo nutno ověřit (žlutá barva), analýza 20,7 % selhala (červená barva), pouze 21,5 % výsledků bylo bez komplikací (modrá barva). Tato nízká kvalita výsledků však ve většině případů neměla vliv na odhadovaný věk jedince.

Důvodem může být, že software používá celou sekvenci k vyhodnocení kvality výsledku, což nemusí být relevantní pro analýzu C/T poměru v konkrétním místě sekvence. Proto byla tato kontrola brána spíše jako orientační.

Získaná data procent methylace z PyroMark Q48 Autoprep Software byla posléze vyhodnocena pomocí věkového kalkulátoru volně dostupného na webových stránkách firmy BioVectis: <http://biovectis.com/forensic1/age-calculator> (viz Obrázek č. 19). Věkový kalkulátor BioVectis je založen na lineárně regresní rovnici, která byla vytvořená ve výzkumu Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015. Rovnice je následující:

$$3,26847784751817 + 0,465445549010653 \times C7 \text{ ELOVL2} - 0,355450171437202 \times C1 \text{ C1orf132} + 0,306488541137007 \times C7 \text{ TRIM59} + 0,832684435238792 \times C1 \text{ KLF14} + 0,237081243617191 \times C2 \text{ FHL2} = \text{odhadnutý věk jedince}$$

The Age estimation calculator

The calculator estimates human age based on five epigenetic markers
Instruction:

1. Enter the percentage of marker methylation level (from 0 to 100%).
2. Press the AgePlex button - the estimated age will be shown in years

Marker	[%]
ELOVL2 - C7	76
C1orf132 - C1	52
TRIM59 - C7	35
KLF14 - C1	7
FHL2 - C2	41

AgePlex

Estimated Age
46

Obrázek č. 19: Kalkulátor pro odhad věku dostupný na webu BioVectis, odhadovaný věk je pro vzorek CZG-668.

5.2 Analýza kontrolní DNA

V první fázi byla nová verze kitu pro pyrosekvenaci otestována pomocí kontrolní DNA EpiTect Control DNA od firmy QIAGEN (plně methylovaná DNA, plně nemethylovaná DNA a jejich směs v poměru 1:1). Tato kontrolní DNA se využívá ke standardizaci systému. Výsledky pyrosekvenační analýzy u kontrolní DNA byly provedeny ve třech opakováních (viz Tabulka č. 11).

Tabulka č. 11: Procenta methylace u plně methylované a plně nemethylované kontrolní DNA a jejich směsi v poměru 1:1.

	<i>ELOVL2</i> [%]			<i>C1orf132</i> [%]			<i>TRIM59</i> [%]			<i>KLF14</i> [%]			<i>FHL2</i> [%]			odhad věku		
metlyovaná DNA	79	84	80	78	77	81	89	81	88	79	76	71	75	78	65	123	122	113
nemetylovaná DNA	6	6	7	5	5	6	4	6	3	4	3	3	5	4	3	10	10	9
směs DNA 1:1	34	34	34	38	40	41	34	37	36	43	42	44	24	26	25	58	57	58

Pozn.: Barevná výplň reprezentuje kvalitu výsledků (modrá/žlutá/červená, viz výše).

Průměr procent methylace tří opakování u všech markerů tří kontrol byl posléze porovnán se všemi dalšími do testování zapojenými laboratořemi. Data z ostatních laboratoří byla převzata z připravované vědecké publikace z tohoto testování: „Kampmann M.-L., Børsting C., Drábek J., Papin J., Gauthier Q., Fleckhaus J., McCord B., Schneider P. M., Morling N. (2021): Collaborative exercise: Analysis of age estimation using the AgePlex kit and the PyroMark Q48 platform“ vytvořené ve spolupráci všech pěti laboratoří (Section of Forensic Genetics, University of Copenhagen, Denmark; Institute of Legal Medicine, University of Cologne, Germany; Laboratoire d'Hématologie Médico-Légale, France; Department of Chemistry and Biochemistry, Florida International University, Miami, USA; DNA laboratory IMTM, Palacký University Olomouc, the Czech Republic) (viz Tabulka č. 12 a 13).

Tabulka č. 12: Průměr procent methylace u vzorků kontrolní DNA u všech do testování zapojených laboratoří.

kontrolní DNA	laboratoř	<i>ELOVL2</i> [%]	<i>C1orf132</i> [%]	<i>TRIM59</i> [%]	<i>KLF14</i> [%]	<i>FHL2</i> [%]
plně methylovaná DNA	Olomouc	80	78	88	76	75
	Dánsko	72	73	98	78	55
	Francie	80	85	90	80	56
	USA	85	83	91	82	67
	Německo	73	85	88	77	38
plně nemethylovaná DNA	Olomouc	6	5	4	3	4
	Dánsko	11	8	4	3	12
	Francie	10	1	6	2	5
	USA	9	7	4	2	3
	Německo	12	4	5	3	7
směs 1:1	Olomouc	34	40	36	43	25
	Dánsko	38	42	49	49	33
	Francie	34	49	36	41	22
	USA	36	49	40	43	35
	Německo	37	43	42	41	18

Průměrná procenta methylace byla statisticky porovnána pomocí směrodatné odchylky (SD) (viz Tabulka č. 13).

Tabulka č. 13: Hodnoty směrodatné odchylky u vzorků kontrolních DNA.

kontrolní DNA	<i>ELOVL2</i>	<i>C1orf132</i>	<i>TRIM59</i>	<i>KLF14</i>	<i>FHL2</i>
plně methylovaná DNA	4,86	4,66	3,69	2,15	12,51
plně nemethylovaná DNA	2,06	2,45	0,80	0,49	3,19
směs 1:1	1,60	3,72	4,80	2,94	6,47

Na základě hodnot SD lze vidět, že nejnižší odchylku z kontrolních DNA vykazovala plně nemethylovaná DNA, tudíž u tohoto vzorku byly nejnižší rozdíly v procentech methylace naměřených všemi pěti laboratořemi. Naopak plně methylovaná DNA vykazovala u většiny markerů vysoké hodnoty SD, což značí i vysokou variabilitu v naměřených hodnotách procent methylace mezi laboratořemi. Nejvyšší hodnoty SD byly pak zaznamenány u CpG lokusu *FHL2*, kdy u plně methylované kontroly byla hodnota SD dokonce 12,5. Zvláště hodnoty procent methylace z Dánské laboratoře byly velmi odlišné od hodnot z ostatních laboratoří, a také proto jsou některé hodnoty SD velmi vysoké. Na základě toho lze vyvodit, že vzorky kontrolní DNA od firmy QIAGEN nejsou příliš vhodné pro standardizaci systému (více v Kampmann *et al.*, 2021).

5.3 Analýza DNA z periferní krve ve třech opakováních

Ve 2) části byla nová verze kitu testovaná na vzorcích DNA vyizolovaných z periferní krve 15 dárců krve obou pohlaví ve věku 20–55 let. Každý vzorek byl analyzován ve třech opakováních. Následně byl vypočítán průměr hodnoty procenta methylace ze všech tří opakování pro každý marker u každého jedince (viz Tabulka č. 14).

Tabulka č. 14: Procenta methylace ve třech opakováních s jejich průměrnými hodnotami pro všechny markery u 15 jedinců ve věku 20–55 let.

vzorek	<i>ELOVL2</i> [%]				<i>C1orf132</i> [%]				<i>TRIM59</i> [%]			<i>KLF14</i> [%]			<i>FHL2</i> [%]					
18-1494-DG-4916 CZG-DNA-00285	43	46	48	45,7	35	33	27	31,7	28	30	30	29,3	2	3	3	2,7	27	28	28	27,7
19-0160-DG-6616 CZG-DNA-00703	57	57	53	55,7	61	59	60	60	32	34	31	32,3	4	4	3	3,7	30	30	28	29,3
18-1101-DG-4214 CZG-DNA-00115	60	56	58	58	61	60	59	60	26	23	27	25,3	3	4	3	3,3	33	33	32	32,7
18-1423-DG-4828 CZG-DNA-00255	58	60	58	58,7	58	53	56	55,7	29	30	32	30,3	4	3	3	3,3	28	29	11	22,7
18-1126-DG-4240 CZG-DNA-00135	57	58	53	56	51	57	51	53	28	28	26	27,3	5	4	4	4,3	30	29	29	29,3

vzorek	ELOVL2 [%]				C1orf132 [%]				TRIM59 [%]				KLF14 [%]			FHL2 [%]				
18-1108-DG-4221 CZG-DNA-00122	53	53	59	55	61	56	61	59,3	29	29	26	28	4	4	4	4	29	31	25	28,3
18-2425-DG-5991 CZG-DNA-00592	63	67	66	65,3	58	57	53	56	25	28	33	28,7	4	5	2	3,7	34	33	31	32,7
18-2015-DG-5574 CZG-DNA-00479	66	57	50	57,7	45	44	46	45	32	34	38	34,7	5	8	5	6	35	33	33	33,7
19-2825-DG-10645	62	61	58	60,3	50	46	46	47,3	40	38	34	37,3	7	7	4	6	22	35	34	30,3
18-2018-DG-5577 CZG-DNA-00482	63	62	66	63,7	58	55	60	57,7	29	31	29	29,7	5	5	4	4,7	35	35	31	33,7
18-1747-DG-5182 CZG-DNA-00415	71	72	74	72,3	62	61	60	61	34	38	41	37,7	6	6	5	5,7	39	38	40	39
18-1251-DG-4482 CZG-DNA-00193	56	62	65	61	41	36	36	37,7	34	37	36	35,7	6	5	5	5,3	38	36	35	36,3
18-0988-DG-4073 CZG-DNA-00052	74	70	75	73	46	45	45	45,3	40	40	44	41,3	10	8	7	8,3	46	43	42	43,7
18-1159-DG-4282 CZG-DNA-00160	77	74	76	75,7	45	45	47	45,7	45	42	42	43	8	7	8	7,7	43	46	42	43,7
18-0946-DG-4029 CZG-DNA-00012	76	78	77	77	45	48	43	45,3	52	47	50	49,7	8	8	8	8	39	36	38	37,7

Pozn. Barevná výplň reprezentuje kvalitu výsledků (modrá/žlutá/červená, viz výše); tučné hodnoty v zelených polích reprezentují průměr hodnot procent methylace u jednotlivých markerů.

Na základě hodnot z Tabulky č. 14 byly vypočítány hodnoty SD pro každý triplet u každého markeru (viz Tabulka č. 15). Následně byla stanovena průměrná SD pro každý marker.

Tabulka č 15: Směrodatná odchylka úrovně methylace pro každý triplet a jejich průměr u všech markerů.

marker	Směrodatná odchylka hodnot methylace															průměr SD
	285	703	115	255	135	122	592	479	10645	482	415	193	52	160	12	
ELOVL2	2,52	2,31	2	1,15	2,65	3,46	2,08	8,02	2,08	2,08	1,53	4,58	2,65	1,53	1	2,64
C1orf132	4,16	1	1	2,52	3,46	2,89	2,65	1	2,31	2,52	1	2,89	0,58	1,15	2,52	2,11
TRIM59	1,15	1,53	2,08	1,53	1,15	1,73	4,04	3,06	3,06	1,15	3,51	1,53	2,31	1,73	2,52	2,14
KLF14	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0	1,53	1,73	1,73	0,58	0,58	0,58	1,53	0,58	0	0,78
FHL2	0,58	1,15	0,58	10,12	0,58	3,06	1,53	1,15	7,23	2,31	1	1,53	2,08	2,08	1,53	2,43

Nejnižší hodnota průměru SD byla stanovena pro marker *KLF14*, který vykazoval SD pouze 0,78. Methylace u *KLF14* dosahuje nejnižších hodnot ze všech pěti markerů a rozsah těchto hodnot je nízký, což může být důvodem nejnižší variability u tohoto markeru. Nejvyšší hodnoty průměru SD byly stanoveny na 2,64 u *ELOVL2* a 2,43 u *FHL2*, což bylo převážně způsobeno vysokou hodnotou SD u vzorků CZG479 (8,02) u *ELOVL2* a CZG255 (10,12) a 10645 (7,23) u *FHL2*. Obecně ale všechny průměrné hodnoty SD u všech markerů vykazují

nízké hodnoty, což značí nízkou variabilitu mezi jednotlivými opakováními. To potvrzuje, že tato metoda vykazuje poměrně vysokou robustnost.

Za použití kalkulátoru věku od BioVectis byl na základě údajů z Tabulky č. 14 vypočítán odhad věku u všech 15 jedinců pro všechna opakování. Následně byl vypočítán průměrný odhad věku u každého jedince (viz Tabulka č. 16).

Tabulka č. 16: Odhad věku pro 15 jedinců na základě hodnot z Tabulky č. 14 a jejich skutečný věk a věková kategorie.

vzorek	věková kategorie	skutečný věk	odhad věku			průměr odhadu věku
18-1494-DG-4916 CZG-DNA-00285	20–25	20	27	31	34	31
19-0160-DG-6616 CZG-DNA-00703	20–25	23	28	30	25	28
18-1101-DG-4214 CZG-DNA-00115	20–25	25	28	26	28	27
18-1423-DG-4828 CZG-DNA-00255	20–25	25	29	31	25	28
18-1126-DG-4240 CZG-DNA-00135	20–25	28	32	29	28	30
18-1108-DG-4221 CZG-DNA-00122	20–25	29	25	28	26	26
18-2425-DG-5991 CZG-DNA-00592	30–35	30	31	35	34	33
18-2015-DG-5574 CZG-DNA-00479	30–35	32	40	39	34	38
19-2825-DG-10645	30–35	35	38	41	36	38
18-2018-DG-5577 CZG-DNA-00482	40–45	40	33	35	32	33
18-1747-DG-5182 CZG-DNA-00415	40–45	41	39	41	43	41
18-1251-DG-4482 CZG-DNA-00193	40–45	45	39	43	44	42
18-0988-DG-4073 CZG-DNA-00052	50–55	51	53	49	51	51
18-1159-DG-4282 CZG-DNA-00160	50–55	52,8	54	51	51	52
18-0946-DG-4029 CZG-DNA-00012	50–55	55	54	52	55	54

Hodnoty z Tabulek č. 14 a 16 byly použity ve společném testování nové verze kitu, kterého se kromě naší laboratoře zúčastnily čtyři další forenzní laboratoře z Dánska, Francie, Německa a USA (viz 5.2 Analýza kontrolní DNA; Kampmann *et al.*, 2021). Dohromady bylo použito 49 vzorků DNA jedinců ve věku 20–69 let ze všech pěti laboratoří. Výsledky z tohoto testování jsou použity v diskusi této diplomové práce.

5.4 Analýza DNA z periferní krve

V části 3) bylo otestováno 217 jedinců bez opakování. Pouze vzorky, u kterých byly výsledky analýzy špatné (velký rozdíl odhadovaného věku oproti chronologickému, rozdíl 8 let a více), byly analyzovány znovu. Opětné analýze bylo podrobena 18 vzorků. Špatné výsledky mohly být způsobeny chybou při některém kroku v metodice (chyba při pipetování,

kontaminace vzorku, chybné naředení primerů atd.) nebo použitím závadných chemikálií (bisulfitační roztok je velice citlivý a použití tohoto roztoku po datu expirace může vést ke špatným výsledkům analýzy). Při opětovném velkém rozdílu mezi odhadovaným a skutečným věkem byla procenta methylace obou měření zprůměrována a tyto průměry byly použity pro stanovení věku. V případě výrazně lepšího výsledku při opakovaném pokusu byl brán pouze ten pokus s lepším výsledkem. Do analýzy výsledků byly zařazeny i vzorky z části 2), takže v části 3) bylo dohromady analyzováno 232 vzorků. Methylace u každého ze vzorků z části 2) byly zprůměrovány a z těchto průměrných procent byl vypočítán věk jedince zařazený do této části analýzy (viz Tabulka č. 14, údaje v zelených polích). Vzorky pocházely z let 2018–2019 (dva vzorky pocházely z roku 2021, neboť musely být znovu izolovány) a byly otestovány už 1. verzí daného kitu laboratorní technikou Mgr. Helenou Jurtíkovou ve spolupráci s dalšími pracovníky DNA laboratoře IMTM. 1. verze kitu byla založena na stejném principu a využívala stejných CpG míst, ale její přesnost nebyla dostatečná pro komerční využití (rozdíl mezi chronologickým a odhadovaným věkem byl příliš vysoký u velké části vzorků, viz Příloha č. 3). Proto byla vyvinuta nová verze s novými primery, která je nyní testována na stejných vzorcích jako 1. verze pro porovnání obou verzí mezi sebou.

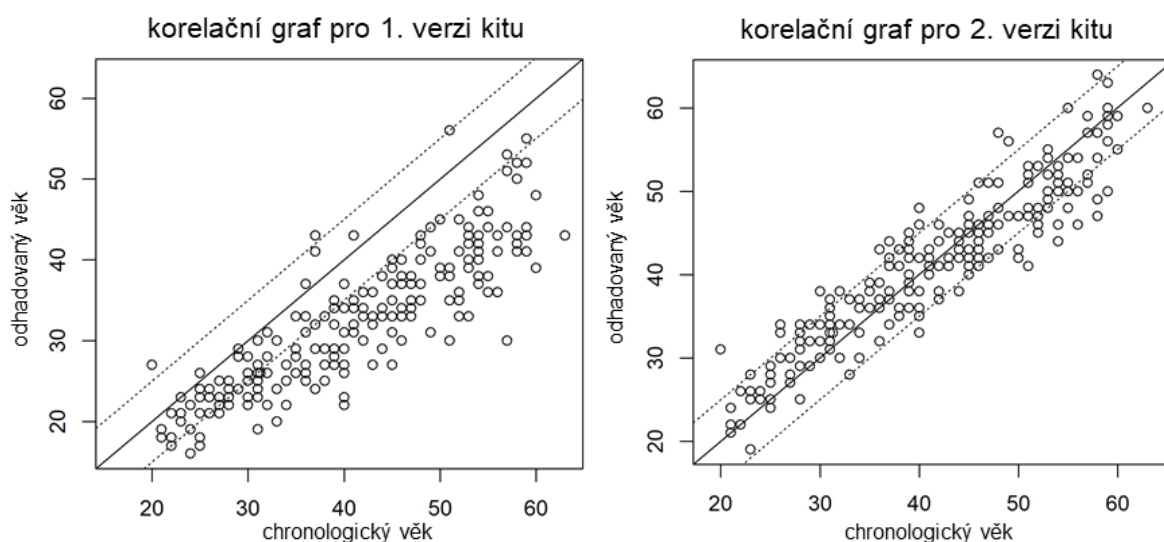
Kompletní seznam hodnot procent methylace u všech CpG míst u všech pěti markerů (*ELOVL2*, *C1orf132*, *TRIM59*, *KLF14*, *FHL2*) pro 2. verzi (mnou testovaná) a 1. verzi (testovaná Mgr. Jurtíkovou) kitu včetně hodnocení kvality výsledků (pouze pro 2. verzi kitu) všech 232 dárců krve testovaných ve 2) a 3) části lze nalézt v části Přílohy (Příloha č. 2). Na základě těchto hodnot byl odhadnut věk u všech jedinců (pomocí BioVectis kalkulátoru věku). V Příloze č. 3 lze vidět odhadovaný věk všech 232 testovaných jedinců pro oba kity a jejich skutečný chronologický věk. Jedinci byli také rozděleni do věkových kategorií po 10 letech pro srovnání přesnosti i u jednotlivých věkových skupin.

Statistická analýza dat byla provedena ve spolupráci s Mgr. Janou Vrbkovou, Ph.D.

5.4.1 Korelační analýza věku

Na základě hodnot odhadu věku (viz Příloha č. 3) byla provedena korelační analýza, která ukazuje vzájemnou lineární závislost mezi dvěma veličinami, v tomto případě mezi chronologickým věkem a odhadovaným věkem u všech jedinců podrobených testování. Korelační koeficient (r) může nabývat hodnot od -1 až do 1 a vyjadřuje míru závislosti mezi veličinami (1 = přímá závislost; -1 = nepřímá závislost; 0 = není žádná závislost).

Pro 2. verzi kitu (testována mnou) bylo $r = 0,94$ a pro 1. verzi (testována Mgr. Jurtíkovou) bylo $r = 0,89$. Obě tyto hodnoty značí poměrně vysokou míru korelace, tedy že je zde vysoká závislost mezi chronologickým a odhadovaným věkem. Při porovnání obou verzí kitů 2. verze vykazuje vyšší korelaci než 1. verze, což naznačuje i vyšší přesnost analýzy u této verze. To lze názorně vidět na Obrázku č. 20, který ukazuje korelační graf obou verzí.



Obrázek č. 20: Korelační grafy závislosti mezi chronologickým a odhadovaným věkem u 1. a 2.verze kitu.

Při porovnání obou grafů je vidět, že data u 2. verze jsou blíže ke spojnici trendu než u 1. verze. Koeficient determinace (r^2), který vyjadřuje kvalitu modelu je $r^2 = 0,884$ u 2. verze a $r^2 = 0,792$ u 1. verze. Model predikce věku pro 2. verzi kitu tedy vysvětluje 88,4 % věkového rozptylu, zatímco 1. verze kitu vysvětluje 79,2 % věkového rozptylu. Na základě těchto hodnot lze vyvodit, že silnější korelace u 2. verze kitu pravděpodobně značí jeho vyšší přesnost oproti 1. verzi, což ale musí být potvrzeno výpočtem střední absolutní odchylky pro oba kity.

5.4.2 Střední absolutní odchylka

Následně byl proveden výpočet střední absolutní odchylky (MAD z anglického mean absolute deviation) zahrnující všech 232 testovaných jedinců, a pak byl MAD stanoven pro každou věkovou kategorii zvlášť. Věkové kategorie byly rozděleny po 10 letech kromě poslední kategorie zahrnující jedince ve věku 50–63 let. MAD byl vypočítán pro obě verze kitu na základě dat z Přílohy č. 3 (viz Tabulka č. 17).

Tabulka č. 17: Hodnoty MAD pro jednotlivé věkové skupiny a celkový MAD pro 2. a 1. verzi kitu.

věková skupina	počet jedinců	MAD 2. verze	MAD 1. verze
20–29 let	42	2,95 let	3,71 let
30–39 let	65	2,98 let	6,91 let
40–49 let	63	2,65 let	9,92 let
50–63 let	62	4,18 let	13 let
20–39 let	107	2,97 let	5,66 let
40–63 let	125	3,42 let	11,60 let
celkový	232	3,21 let	8,78 let

MAD vyjadřuje průměrnou vzdálenost mezi každou hodnotou dat a průměrem. Ukazuje míru variability v systému, kdy jsou hodnoty MAD přímo úměrné variabilitě dat. V tomto případě čím vyšších hodnot MAD dosáhne, tím větší je rozdíl mezi chronologickým a odhadovaným věkem. To znamená, že čím nižších hodnot MAD dosáhne, tím je daný kit přesnější. Na základě Tabulky č. 17 lze vidět, že přesnost 2. verze kitu je mnohem vyšší než přesnost 1. verze. Hodnoty MAD pro věkové kategorie a celkový MAD pro 2. verzi jsou při porovnání s 1. verzí nižší u některých kategorií dokonce i více než 3×. Celkový MAD = 3,21 let pro 2. verzi kitu ukazuje, že průměrný rozdíl mezi chronologickým věkem a odhadovaným věkem zahrnující všechny testované jedince je 2,7× nižší než u 1. verze kitu, kde je MAD = 8,78 let. Nejmenší rozdíl v hodnotách MAD mezi 1. a 2. verzí kitu byl zaznamenán u nejmladší věkové kategorie 20–29 let. Rozdíl v hodnotách MAD mezi oběma kity roste s věkem. Hodnoty MAD u jednotlivých věkových kategorií u 1. verze kitu vykazují zvyšující se hodnoty, což značí nižší přesnost kitu s přibývajícím věkem. U poslední kategorie 50–63 let je MAD dokonce 13 let. Na základě MAD hodnot pro 1. verzi kitu lze tedy vidět, že tento kit je velmi nepřesný, tudíž nevhodný pro komerční účely. Naopak 2. verze kitu vykazuje nízké hodnoty MAD a zdá se být vhodnou pro použití ve forenzních vědách.

U 1. verze kitu lze vidět, že hodnoty MAD s věkem rostou a nejnižších hodnot dosahoval MAD u nejmladší věkové kategorie (3,71 let; 20–29 let) a nejvyšších hodnot u nejstarší věkové kategorie (13 let; 50–63 let). Naopak u 2. verze kitu jsou hodnoty MAD pro jedince 20–29 let, 30–39 let a 40–49 let podobné (2,95; 2,98 a 2,65 let), až u věkové kategorie 50–63 let lze pozorovat mírně vyšší hodnoty MAD (4,18 let). Překvapivě nejnižších hodnot MAD bylo u této verze stanoveno u věkové skupiny 40–49 let (2,65 let), což ukazuje na největší přesnost odhadu pro tuto kategorii. Rozdíl v přesnosti kitu u nejstarší kategorie může být způsoben faktory, které ovlivňují metylaci DNA, jako je životní styl, socioekonomický status atd. (viz 3.1.2 Forenzní epigenetika) a epigenetickým driftem (viz 3.2.1 Určování věku na

základě methylace DNA). S věkem tedy narůstá variabilita v methylaci DNA, což může logicky vysvětlit nižší přesnost v odhadu věku u starších jedinců.

Analýza MAD potvrzuje výsledky korelační analýzy věku, a sice že 2. verze kitu je opravdu přesnější než 1. verze. U hodnot MAD je tento rozdíl ještě lépe pozorovatelný než u korelační analýzy věku. Zlepšila se i přesnost odhadu u starších jedinců (zvláště pro jedince do 49 let). I proto se zdá být tato verze vhodná pro komerční účely, neboť výrazně zlepšila tento nedostatek z předchozí verze kitu.

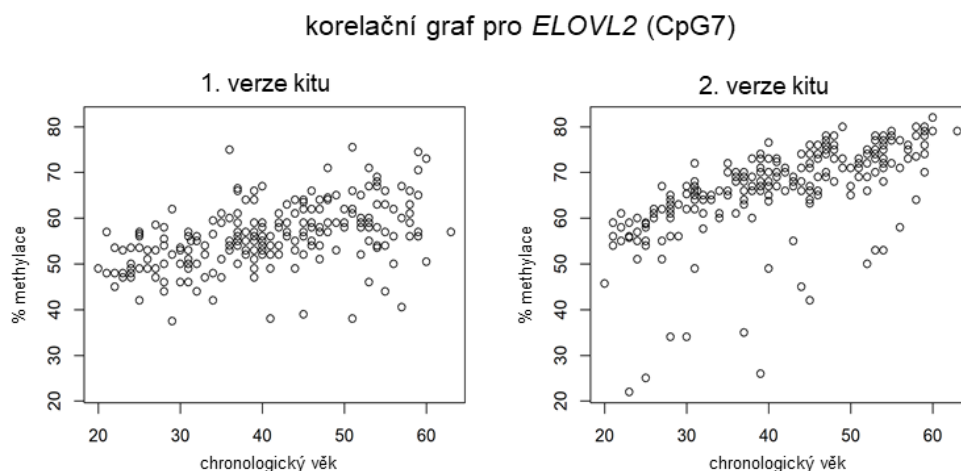
5.4.3 Korelační analýza methylace a věku

Pro ověření závislosti mezi úrovní methylace a věkem jedince byla provedena korelační analýza pro každé CpG místo u všech pěti markerů u obou kitů na základě dat z Přílohy č. 2. Hodnoty blízké $r = 1$ vyjadřují pozitivní korelaci, tedy čím je jedinec starší, tím vyšších hodnot procento methylace dosahuje. Naopak hodnoty blízké $r = -1$ vyjadřují negativní korelaci a procento methylace s přibývajícím věkem klesá. Hodnoty blízké $r = 0$ nevykazují žádnou korelaci, není zde tedy žádná závislost mezi věkem jedince a procentem methylace.

Pro 1. verzi kitu bylo r stanoveno: $r = 0,52$ pro *ELOVL2*, $r = -0,72$ pro *C1orf132*, $r = 0,68$ pro *TRIM59*, $r = 0,75$ pro *KLF14* a $r = 0,69$ pro *FHL2*.

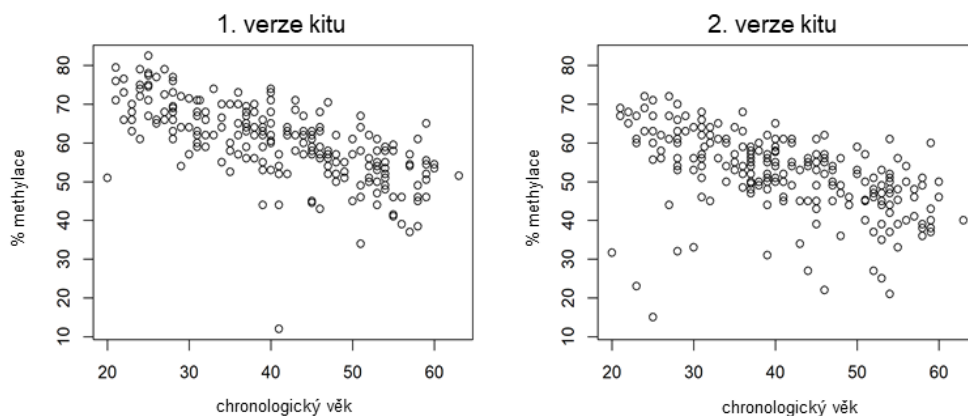
Pro 2. verzi kitu bylo r stanoveno: $r = 0,74$ pro *ELOVL2*, $r = -0,62$ pro *C1orf132*, $r = 0,7$ pro *TRIM59*, $r = 0,7$ pro *KLF14* a $r = 0,83$ pro *FHL2*.

Na Obrázcích č. 21–25 lze názorně vidět korelaci u všech markerů mezi procenty methylace a chronologickým věkem.



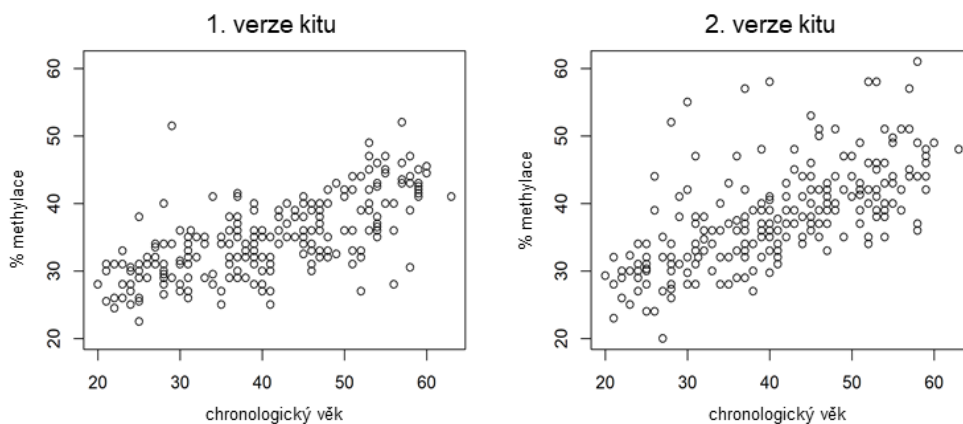
Obrázek č. 21: Korelační graf pro CpG7 u *ELOVL2* ukazující závislost mezi % methylací a věkem u obou kitů.

korelační graf pro *C1orf132* (CpG1)



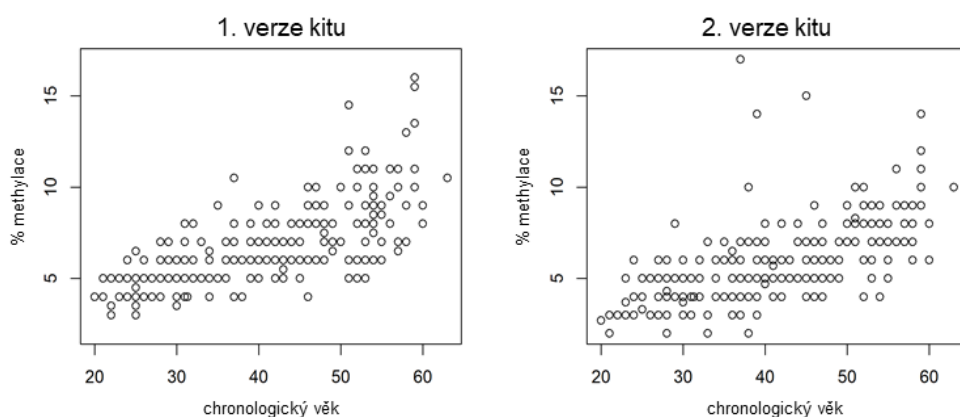
Obrázek č. 22: Korelační graf pro CpG1 u *C1orf132* ukazující závislost mezi % methylation a věkem u obou kitů.

korelační graf pro *TRIM59* (CpG7)

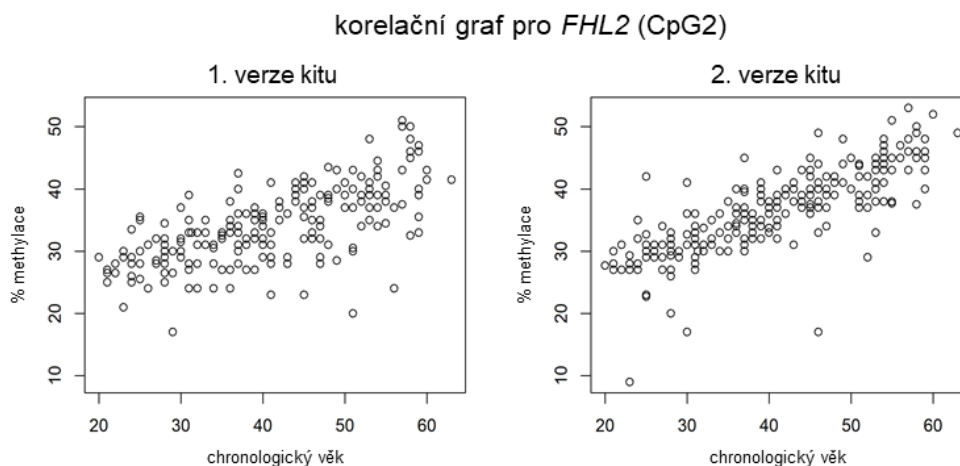


Obrázek č. 23: Korelační graf pro CpG7 u *TRIM59* ukazující závislost mezi % methylation a věkem u obou kitů.

korelační graf pro *KLF14* (CpG1)



Obrázek č. 24: Korelační graf pro CpG1 u *KLF14* ukazující závislost mezi % methylation a věkem u obou kitů.



Obrázek č. 25: Korelační graf pro CpG2 u *FHL2* ukazující závislost mezi % methylace a věkem u obou kitů.

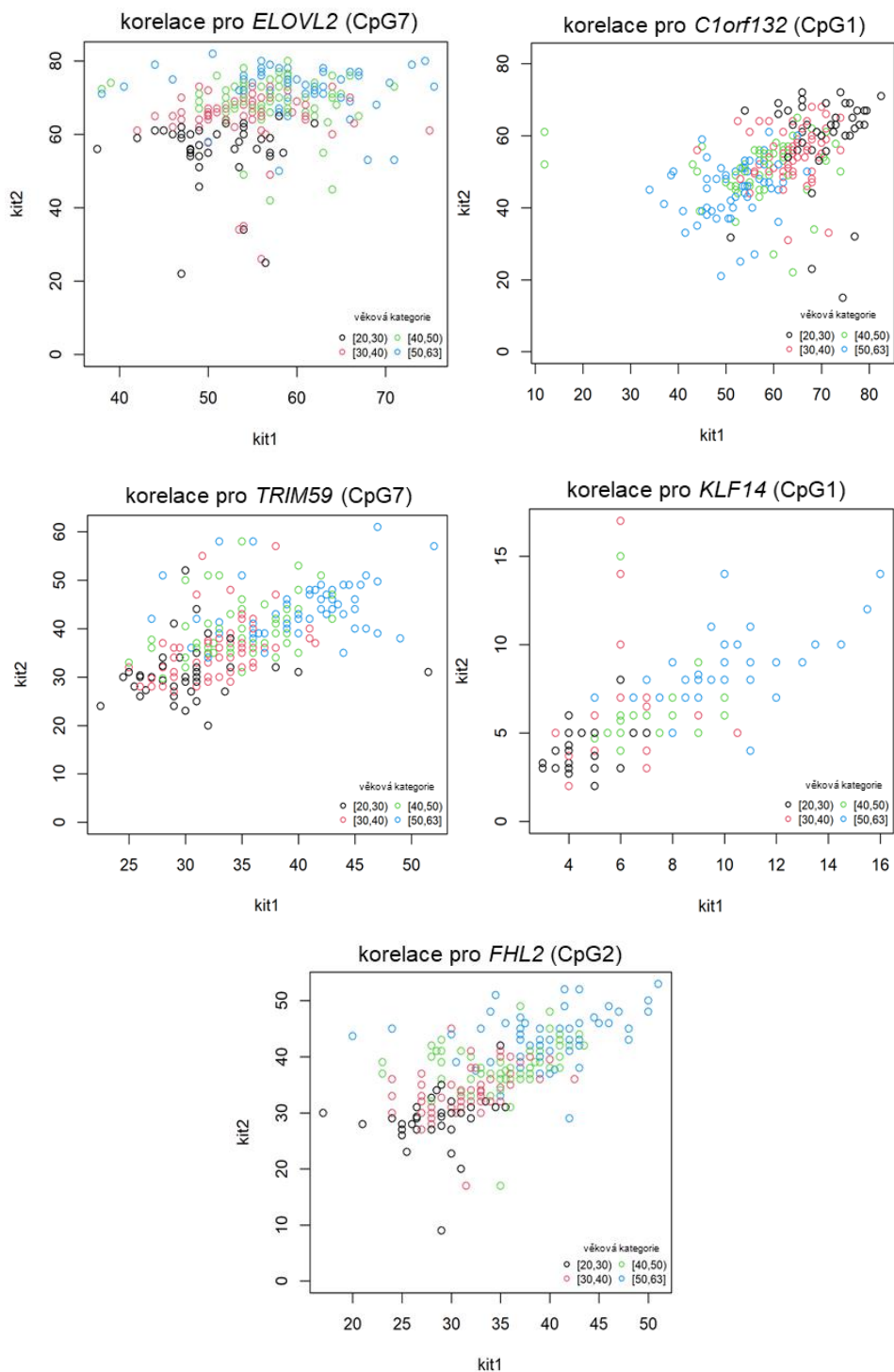
Dle hodnot r a Obrázků č. 21–25 lze pozorovat, že marker *C1orf132* jako jediný vykazuje negativní korelaci, tzn. s vzrůstajícím věkem hodnoty methylace klesají. Ostatní 4 markery vykazují pozitivní korelaci a jejich hodnoty methylace rostou s věkem.

Nejvyšší korelaci pro 1. verzi kitu vykazoval marker *KLF14*, který vysvětlil 56,3 % ($r^2 = 0,563$) věkového rozptylu v této sadě vzorků. U 2. verze tento marker vykazoval o trochu nižší korelaci s vysvětlením 49 % ($r^2 = 0,49$) věkového rozptylu. Naopak nejvyšší korelaci pro 2. verzi kitu vykazoval marker *FHL2*, který vysvětlil 68,9 % ($r^2 = 0,689$) věkového rozptylu. Tento marker vykazoval výrazně nižší korelaci pro 1. verzi kitu s vysvětlením 47,6 % ($r^2 = 0,476$) věkového rozptylu v této sadě. Nejnižší korelace bylo dosaženo u *ELOVL2* pro 1. verzi kitu, který vysvětlil pouze 27 % věkového rozptylu. Tento marker zaznamenal nejvyšší rozdíl v hodnotách r a r^2 , a tedy v korelaci mezi oběma kity. U 2. verze kitu *ELOVL2* vysvětlil 54,8 %, což je 2× více než u 1. verze kitu. Nejnižší korelace u 2. verze kitu byla zaznamenána u *C1orf132* s vysvětlením 38,4 % ($r^2 = 0,384$), zatímco u 1. verze tento marker vysvětlil 51,8 % ($r^2 = 0,518$). Nejmenší rozdíl v korelaci mezi oběma kity byl zaznamenán u markeru *TRIM59*, který vysvětlil 49 % ($r^2 = 0,49$) věkového rozptylu pro 2. verzi kitu a 46,2 % ($r^2 = 0,462$) pro 1. verzi kitu.

Při porovnání korelace mezi oběma kity 2. verze vykazovala vyšší korelaci pro markery *ELOVL2*, *TRIM59* a *FHL2*, i když u *TRIM59* byl tento rozdíl velmi nízký. Markery *C1orf132* a *KLF14* vykazovaly naopak vyšší korelaci u 1. verze kitu.

5.4.4 Korelační analýza methylace pro 2. a 1. verzi kitu

Pro posouzení variability úrovně methylace mezi oběma kity byla provedena korelační analýza pro každý z 5 markerů na základě dat z Přílohy č. 2 (viz Obrázek č. 26). Barevné body značí jednotlivé věkové skupiny (20–29 let černá, 30–39 let růžová, 40–49 let zelená, 50–63 let modrá). Číselné hodnoty na ose X a Y reprezentují procenta methylace u jednotlivých markerů.



Obrázek č. 26 : Korelace úrovně methylace pro *ELOVL2*, *C1orf132*, *TRIM59*, *KLF14* a *FHL2* pro oba kity.

Čím je hodnota r bližší k 1, tím více jsou si hodnoty procent methylace u 2. a 1. verze kitu podobné, a tím je větší závislost mezi oběma kity pro daný marker. Hodnoty r blízké 0 neznají téměř žádnou korelaci, tzn. že procenta methylace jsou velmi odlišná a nevykazují žádnou závislost mezi 2. a 1. verzí kitu pro daný marker. Negativní korelace (hodnoty blízké $r = -1$) nebyla v tomto modelu očekávána.

Nejvyšší korelace dosahoval marker *KLF14* s $r = 0,75$, který vysvětluje 56,3 % ($r^2 = 0,563$) variability v methylaci. Tento marker dosahuje nejnižších hodnot procent methylace ze všech 5 markerů (hodnoty mezi 2 % až 16 % u obou kitů) a má také nejnižší rozptyl ze všech markerů, což může být důvodem nejvyšší korelace. Druhá nejvyšší korelace byla zaznamenána u markeru *FHL2* s $r = 0,67$, který vysvětluje 44,9 % ($r^2 = 0,449$) variability v methylaci, a který u 2. verze kitu také zaznamenal nejvyšší korelaci s věkem. U *TRIM59* bylo $r = 0,63$ s vysvětlením 39,7 % ($r^2 = 0,397$) variability v methylaci a u *C1orf132* bylo $r = 0,57$ s vysvětlením 32,5 % ($r^2 = 0,325$) variability v methylaci. Téměř žádnou korelaci nevykazoval marker *ELOVL2* s $r = 0,34$, který vysvětluje pouze 11,6 % ($r^2 = 0,116$) variability v methylaci, tzn., procenta methylace se u tohoto markeru mezi kity velmi lišila. Právě marker *ELOVL2* má největší vliv na predikovaný věk v tomto modelu a jeho rozdílné hodnoty mezi oběma kity mohou vysvětlit tak nízkou přesnost 1. verze kitu.

5.4.5 Návrhy modelů pro 2. a 1. verzi kitu

Jak již bylo zmíněno dříve, oba kity vychází z modelu z polské studie Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015. Na tomto modelu, jehož rovnice je uvedena v kapitole 5.1 Hodnocení analýzy pomocí PyroMark Q48 Autoprep Software a BioVectis kalkulátoru věku, je založen BioVectis kalkulátor věku, který byl použit ke stanovení odhadu věku na základě procent methylace u jednotlivých markerů v této práci. Původně se zdálo, že polský model nesedí na českou populaci, a to na základě výsledků z 1. verze kitu. 2. verze kitu, která byla testována v této práci naopak ukazuje, že polský model se zdá být vhodný. Tato 2. verze se tedy zdá být vyhovující pro komerční užití ve forenzní praxi. Statistička Mgr. Jana Vrbková, Ph.D. se pokusila na základě výsledků 1. a 2. verze kitu vytvořit nové modely pro větší přesnost těchto kitů.

Model 1A: $15,87005 + 0,16392 \times C7 \text{ ELOVL2} - 0,37845 \times C1 \text{ C1orf132} + 0,39970 \times C7 \text{ TRIM59} + 1,46335 \times C1 \text{ KLF14} + 0,43050 \times C2 \text{ FHL2} = \text{odhadnutý věk jedince}$

Model 1B: $15,87005 + 0,25926 \times C7 \text{ ELOVL2} - 0,28304 \times C1 \text{ C1orf132} + 0,51142 \times C7 \text{ TRIM59} + 1,51346 \times C1 \text{ KLF14} + 0,44340 \times C2 \text{ FHL2} = \text{odhadnutý věk jedince}$

Model 2A: $-2,41053 + 0,43474 \times C7 \text{ ELOVL2} - 0,33487 \times C1 \text{ Clorf132} + 0,24279 \times C7 \text{ TRIM59} + 0,98050 \times C1 \text{ KLF14} + 0,46106 \times C2 \text{ FHL2} =$ odhadnutý věk jedince

Model 2B: $-2,41053 + 0,42637 \times C7 \text{ ELOVL2} - 0,35274 \times C1 \text{ Clorf132} + 0,22305 \times C7 \text{ TRIM59} + 0,96762 \times C1 \text{ KLF14} + 0,45902 \times C2 \text{ FHL2} =$ odhadnutý věk jedince

Model 1A a 1B byl vytvořen pro 1. verzi kitu a model 2A a 2B byl vytvořen pro 2. verzi kitu. Všechny 4 modely byly vyzkoušeny na obou verzích kitu zahrnující všech 232 testovaných jedinců. Následně byly stanoveny hodnoty MAD pro každý model u obou kitů (viz Tabulka č. 18).

Tabulka č. 18: Hodnoty MAD pro modely 1A, 1B, 2A a 2B pro 1. a 2. verzi kitu.

	hodnoty MAD	
	1. verze kitu	2. verze kitu
model 1A	2,99 let	5,34 let
model 1B	2,91 let	5,65 let
model 2A	7,86 let	2,31 let
model 2B	7,77 let	2,32 let
polský model	8,78 let	3,21 let

Hodnoty MAD v Tabulce č. 18 ukazují, že každý z modelů vykazuje poměrně vysokou přesnost pro kit, pro který byl zkonstruován, ale pro druhý z kitů vykazuje nižší přesnost. Na druhou stranu modely 2A a 2B vykazují vyšší přesnost pro 1. verzi kitu než polský model (MAD 7,86 let a 7,77 let vs. 8,78 let). Do budoucna lze tedy uvažovat o použití jednoho z těchto modelů namísto polského modelu, ale to by nejprve vyžadovalo jejich ověření na dalších sadách vzorků (bylo by dobré zahrnout ještě mladší kategorii pod 20 let a starší kategorii nad 63 let). I přes vyšší přesnost 1. verze kitu při použití modelů 2A a 2B je přesnost u této verze stále velmi nízká, a tudíž nedostatečná pro použití ve forenzní praxi. Naopak vysoká přesnost 2. verze byla v této práci statisticky potvrzena a při použití modelu 2A či 2B by potencionálně mohlo být dosaženo ještě lepších výsledků.

6. DISKUSE

Stanovení věku jedince je jednou z nejdůležitějších aplikací biomedicínských forenzních věd. Existují různé metody pro určení věku jedince (viz 3.2 Určování věku). Z nejslibnějších jsou metody založené na methyloaci DNA (viz 3.3 Bisulfitická konverze, 3.5 Bisulfitické sekvenování a 3.6. Další metody analýzy methyloace). Cílem této diplomové práce bylo provést validaci kitu PyroMark Q48 FX Age Assay, kterou vyvinula německá firma QIAGEN na základě polského výzkumu (Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015). Podstatou této metody je stanovení úrovně methyloace u 5 CpG míst u 5 genů (CpG místa 7 pro *ELOVL2*, CpG místa 1 pro *C1orf132*, CpG místa 7 pro *TRIM59*, CpG místa 1 pro *KLF14* a CpG místa 2 pro *FHL2*) pomocí bisulfitické pyrosekvenace. Již dříve byla vyvinuta 1. verze kitu, která byla otestovaná v DNA laboratoři IMTM Mgr. Jurtíkovou a dalšími členy laboratoře. Tato verze ale nebyla dostatečně přesná, proto byla vyvinuta 2. verze kitu, jejíž testování je předmětem této práce. 2. verze kitu byla testovaná na stejných vzorcích jako 1. verze.

Zmíněné markery byly ve studii Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015 vyselektovány ze 41 kandidátních CpG míst u 8 genů (kromě zmíněných ještě *SLC6A4*, *F5* a *CCDC102B*). Těchto 8 genů bylo vybráno na základě výzkumu Hannum *et al.*, 2013. Podstatou polské studie bylo nalézt co nejnižší počet co nejinformativnějších markerů, tedy těch s nejvyšší korelací s věkem. Nízký počet markerů je důležitý pro možnost rutinního testování (s vysokým počtem markerů by byla analýza příliš komplikovaná), ale nízký počet markerů by neměl být na úkor přesnosti analýzy. Byla vybrána zmíněná CpG místa, kdy největší korelaci vykazoval marker *ELOVL2* s $r = 0,912$ a $r^2 = 0,83$ (83 %). Použití pouze jednoho markeru by bylo ale velice nepřesné, proto se pro testování použily ještě další 4 markery (dle míry korelace): *C1orf132* s $r = -0,889$ a $r^2 = 0,79$ (79 %), *TRIM59* s $r = 0,863$ a $r^2 = 0,74$ (74 %), *FHL2* s $r = 0,843$ a $r^2 = 0,712$ (71 %) a *KLF14* s $r = 0,731$ a $r^2 = 0,53$ (53 %).

Korelace u těchto markerů u 1. a 2. verze kitu na českých vzorcích byla nižší než u polské studie (Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015) až na *KLF14* u 1. verze kitu s $r = 0,75$ a $r^2 = 0,563$ (56,3 %). *KLF14* vykazoval nejvyšší korelaci ze všech markerů pro 1. verzi kitu a dosáhl i mírně vyšší korelace než u polské studie, kde ale tento marker dosahuje nejnižší korelace ze všech 5 markerů. Nejvyšší korelace pro 2. verzi kitu byla zaznamenána u *FHL2* s $r = 0,83$ a $r^2 = 0,689$ (68,9 %), i přesto jsou tyto hodnoty mírně nižší než u *FHL2* markeru v polské studii. Důvodem vyšší korelace u polské studie může být zahrnutí více jedinců mladší generace (zahrnuta i věková skupina 2–19 let), kteří u tohoto modelu zpravidla vykazují lepší výsledky.

Marker *ELOVL2*, který vykazoval největší korelaci v polské studii, vykazoval v české populaci výrazně nižší hodnoty pro 2. verzi kitu s $r = 0,74$ a $r^2 = 0,548$ (54,8 %). U 1. verze kitu hodnoty spolu téměř nekorelovaly ($r = 0,52$ a $r^2 = 0,27$ (27 %)). Tak nízká korelace byla neočekávaná vzhledem k mnoha studiím, které zaznamenaly vysokou korelaci s věkem u tohoto markeru (Garagnani *et al.*, 2012; Bacalini *et al.*, 2017; Sukawutthiya *et al.*, 2021). *ELOVL2* má navíc v modelu největší vliv na predikovaný věk (viz lineární regresní rovnice v kapitole 5.1 Hodnocení analýzy pomocí PyroMark Q48 Autoprep Software a BioVectis kalkulátor věku), kdy i velmi malý rozdíl v hodnotě procenta methylace u tohoto markeru může změnit odhadovaný věk, což může působit nepřesný odhad věku. To je možnou příčinou velmi nízké přesnosti 1. verze kitu. Nízká korelace u tohoto markeru u 2. verze kitu byla pravděpodobně způsobena extrémně nízkými hodnotami procent methylace u těch vzorků, které software vyhodnotil jako špatné (červená barva), ale na základě vysoké přesnosti odhadu věku byly i přes špatné hodnocení kvality do analýzy zařazeny.

Nejnižší hodnoty pro 2. verzi kitu vykazoval *C1orf132* ($r = -0,62$ a $r^2 = 0,384$ (38,4 %)). V připravované publikaci Kampmann *et al.*, 2021, kterého byla část mé analýzy součástí (testování kontrolní DNA a 15 vzorků ve třech opakování), nevykazoval tento marker téměř žádnou korelaci ($r = -0,25$ a $r^2 = 0,06$ (6 %)). Navíc kvalita výsledků u tohoto markeru byla velmi špatná, ve většině případů software vyhodnotil výslednou analýzu markeru jako neúspěšnou (červená barva) či s možnými komplikacemi (žlutá barva). Bylo by tedy vhodné ověřit informativnost tohoto markeru a případně uvažovat o jeho vyřazení z analýzy či jeho nahrazení jiným CpG místem na témže genu či jiným genem.

I přes výrazně nízkou korelaci většiny markerů v tomto testování použitý model vysvětlil 88,4 % ($r = 0,94$; $r^2 = 0,884$) věkového rozptylu u české populace u 2. verze kitu, což je poměrně vysoké procento. 1. verze kitu vykazovala horší výsledky s vysvětlením 79,2 % ($r = 0,89$; $r^2 = 0,792$) věkového rozptylu, což naznačuje vyšší přesnost nové verze kitu. Původní polská studie (Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015) vykazovala lepší výsledky, a sice 94 %, což může být způsobeno již zmíněným zahrnutím věkové skupiny 2–19 let. Připravovaná studie na 2. verzi kitu z pěti laboratoří (Kampmann *et al.*, 2021) vykazovala horší výsledky než 2. verze kitu v naší laboratoři, a sice 83 %, což mohlo být způsobeno nízkým počtem vzorků (49 vzorků pro testování). Dvě korejské studie (Cho *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2019) a jedna singapurská studie (Thong *et al.*, 2017), které také vycházely z polského modelu, vykazovaly taktéž vysokou přesnost predikce věku s 96 % (Cho *et al.*, 2017), 93 % (Jung *et al.*, 2019) a 95,5 % (Thong *et al.*, 2017). Obě korejské studie testovaly 100 jedinců a singapurská studie testovala

116 jedinců. Vyšší přesnost mohla být dána nižším počtem testovaných jedinců nebo také zde mohla hrát roli příslušnost k jiné etnické skupině (v korejských studiích vzorky pocházely od Korejců, v singapurské studii vzorky pocházely od Číňanů, Malajců a Indů z populace Singapuru).

Pro určení přesnosti testování byl stanoven MAD jak pro všechny jedince zahrnuté v testování, tak pro jednotlivé věkové kategorie. Celkový MAD byl stanoven na 3,21 let, zatímco v 1. verzi kitu byl MAD 8,78 let. Je tedy zjevné, že 1. verze kitu nemůže být použita pro komerční účely, proto byla vyvinuta zde testovaná 2. verze. Výsledek této nové verze je dle mého názoru velice dobrý a tento kit se zdá být vhodný pro komerční využití ve forezních laboratořích. Navíc MAD pro tento kit dokonce vykazuje lepší výsledky než v polské studii (Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015), kde byl MAD stanoven na 3,9 let. Tento rozdíl může být způsoben zahrnutím starších jedinců do testování u polské studie (věková skupina 60–75 let, kdy u testování v této práci byl maximální věk testovaného jedince 63 let). U korejské studie (Cho *et al.*, 2017) byl MAD stanoven na 4,18 let a u singapurské studie (Thong *et al.*, 2017) byl MAD stanoven dokonce na 4,8 let. Tyto výsledky jsou horší než u 2. verze kitu a u polské studie. Může zde hrát roli nižší počet vzorků a věk testovaných jedinců. Je otázkou, zda vyšší hodnoty MAD mohou být ovlivněny etnicitou testovaných jedinců, neboť v druhé korejské studii (Jung *et al.*, 2019) byl MAD výrazně nižší než u studie Cho *et al.*, 2017, a sice 3,48 let.

MAD byl stanoven i pro jednotlivé věkové kategorie pro obě verze kitu a srovnán s polskou studií (Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015) a korejskou studií (Cho *et al.*, 2017) (viz Tabulka č. 19).

Tabulka 19: Hodnoty MAD pro jednotlivé věkové kategorie u 2. a 1. verze kitu a u polské (Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015) a korejské (Cho *et al.*, 2017) studie.

	2. verze kitu	1. verze kitu	Zbieć-Piekarska <i>et al.</i> , 2015	Cho <i>et al.</i> , 2017
2–19 let	x	x	2,8 let	x
20–29 let	2,95 let	3,71 let	x	2,42 let
30–39 let	2,98 let	6,91 let	x	2,47 let
20–39 let	2,97 let	9,92 let	3,3 roky	x
40–49 let	2,65 let	13 let	x	3,82 let
50–59 let/50–63 let	4,18 let	5,66 let	x	4,16 let
40–59 let/40–63 let	3,42 let	11,60 let	3,9 let	x
60–69 let	x	x	x	8,67 let
70–74 let	x	x	x	12,28 let
60–75 let	x	x	5,6 let	x
celkový	3,21 let	8,78 let	3,9 let	4,18 let

Pozn.: Věková skupina 50–59 let byla u publikace Cho *et al.*, 2017, zatímco 50–63 let byla u 2. a 1. verze kitu (pouze 3 vzorky nad 59 let), věková skupina 40–59 let byla u Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015, zatímco 40–63 let u 2. a 1. verze kitu (pouze 3 vzorky nad 59 let).

Při porovnání 2. a 1. verze mezi sebou byl MAD u všech věkových kategorií pro 2. verzi několikrát nižší než pro 1. verzi, což potvrzuje nepoužitelnost 1. verze ve forenzních vědách.

Ve studii Cho *et al.*, 2017 byly hodnoty MAD pro jedince ve věku 20–29 let a 30–39 let nízké, dokonce nejnižší ze všech studií z Tabulky č. 19. Přesnost odhadu věku byla u těchto věkových skupin tedy vyšší než u 2. verze kitu, což je překvapivé vzhledem k vysokému celkovému MAD 4,18 let u této studie. Tato hodnota je dle všeho způsobena vysokými hodnotami MAD pro starší testované jedince ve věku 60 až 74 let.

U polské studie (Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015) kategorie 20–39 let a 40–59 let vykazovaly nižší přesnost než u 2. verze kitu, což mohlo být způsobeno drobnými rozdíly v analýze (rozdíl v objemech u PCR reakce, rozdíl v programu PCR reakce atd.).

U většiny studií byla zaznamenána nižší přesnost odhadu se vzrůstajícím věkem testovaných jedinců. V 1. verzi kitu, v polské studii (Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015) a v korejské studii (Cho *et al.*, 2017) se MAD věkových skupin postupně zvyšoval, tedy každá následující věková skupina dosahovala vyšších hodnot MAD než skupina před ní. U 2. verze kitu byly zaznamenány nejvyšší hodnoty MAD u nejstarší kategorie (50–63 let). U věkových kategorií 20–29, 30–39 a 40–49 let dosahoval MAD podobných hodnot, nejnižší MAD byl překvapivě stanoven pro kategorii 40–49 let. Nižší přesnost odhadu u starších jedinců může být způsobena faktory, které ovlivňují úroveň methylace DNA. Kromě věku jsou to faktory jako životní styl, vliv prostředí, nemoci (viz 3.1.2 Forenzní epigenetika), kdy jejich působením může dojít k epigenetickému driftu (viz 3.2.1 Určování věku na základě methylace DNA). S věkem tedy dochází k nárůstu variability v methylaci DNA, což může ovlivnit výsledek predikovaného věku. Největší variabilita je pak logicky zaznamenána u starších jedinců.

Polská studie Spólnicka *et al.*, 2018 testovala dané markery na jedincích s určitými nemocemi, které mohou být potencionálně spojeny se zrychleným stárnutím organismu a mohou ovlivnit přesnost predikovaného věku. Tři skupiny testovaných jedinců byly: 31 pacientů s Alzheimerovou nemocí s časným začátkem, 68 pacientů s Alzheimerovou nemocí s pozdním začátkem a 91 pacientů s Gravesovou–Basedowovou nemocí. U pacientů s Alzheimerovou nemocí s pozdním začátkem nemoc neovlivnila stav methylace daných markerů, a tedy neměla vliv na odhadovaný věk. Pacienti s Alzheimerovou nemocí s časným začátkem a s Gravesovou–Basedowovou nemocí vykazovali zrychlenou hypermethylaci C7 u *TRIM59* zvláště u mladších jedinců, což mělo vliv na přesnost odhadu věku (v průměru 9 let pro Alzheimerovu nemoc). Pro skupinu s Alzheimerovou nemocí s časným začátkem byla u mladších jedinců zaznamenána zvýšená methylace u C1 *KLFI4*. Pro skupinu

s Gravesovou-Basedowovou nemocí byla u mladších jedinců zaznamenána snížená methylace u C2 *FHL2*. Pouze u markerů *ELOVL2* a *C1orf132* nebyl zaznamenán vliv zmíněných nemocí na jejich methylaci. Tato studie tedy potvrzuje hypotézu o ovlivnění odhadu věku dalšími faktory. Dle mého názoru by bylo vhodné provést studii zahrnující další faktory, které mohou ovlivnit stav methylace jako např.: konzumace alkoholu, kouření, tělesná hmotnost/stravovací návyky atd.

Výsledky 2. verze kitu ukazují na jeho velkou přesnost, což dává možnost jeho potencionálního využití v řešení kriminálních případů. Jako potencionální řešení pro zvýšení přesnosti analýzy může být přidání jednoho či více CpG místa (tedy využití 6 či více markerů) nebo zvolení jiných CpG míst. V korejské studii (Cho *et al.*, 2017) byl vyzkoušen další model se stejnými markery, ale s jinými CpG místy (C1 pro *ELOVL2*, C1 pro *C1orf132*, C5 pro *TRIM59*, C1 pro *KLF14* a C1 pro *FHL2*), který měl vyšší přesnost u této studie než polský model (MAD = 3,34 let). Ještě větší přesnosti (MAD = 3,29 let) bylo dosaženo využitím 6 CpG míst (C1 a C4 pro *ELOVL2*, C1 pro *C1orf132*, C8 pro *TRIM59* a C1 a C8 pro *FHL2*). Do budoucna by bylo dobré pro větší možnost využití kitu jeho otestování i na dalších tkáních a tělních tekutinách (např.: na spermatu, na DNA z vlasů a na dalších zdrojích DNA, které mohou být na inkriminovaném místě nalezeny).

V případě zavedení kitu do forenzní praxe pro stanovení věku neznámých jedinců je nutnost ověřit správnost analýzy. Chybné výsledky analýzy by mohly přinést komplikace v případě a zavedení kitu by bylo tím pádem kontraproduktivní. Analýza kvality výsledků pomocí PyroMark Q48 Autoprep Software je jednou z možností, bohužel tato analýza nemá vysokou přesnost. Například u markeru *C1orf132* vyhodnotil software 57,8 % výsledků s možnými komplikacemi (žlutá barva) a u 20,7 % analýza selhala (červená barva), pouze u 21,5 % byla analýza bez komplikací (modrá barva), i přesto v drtivé většině případů neměl výsledek kvality u tohoto markeru vliv na odhadovaný věk. Studie Kampmann *et al.*, 2021 v zásadě ignorovala hodnocení kvality výsledků software PyroMark Q48, neboť 218 výsledků z 960 software vyhodnotil jako špatné (červená barva) či s možnými komplikacemi (žlutá barva), ale při kontrole všech výsledků vyškolenými analytiky byly pouze 3 výsledky z 960 vyhodnoceny jako nepoužitelné, a sice všechny u markeru *KLF14*. Na druhou stranu při selhání analýzy (červená barva) u markeru *ELOVL2* byl v mnoha případech výsledný odhad věku velmi nepřesný, tudíž v případě tohoto markeru by hodnocení software mohlo být použito. V každém případě by měly být výsledné pyrogramy vyhodnoceny vyškolenými analytiky. Také by vzorky

měly být analyzovány ve více opakováních, což by vzhledem k nízké spotřebě DNA neměl být problém.

Na základě dat z 1. a 2. verze kitu byly statističkou Mgr. Janou Vrbkovou, Ph.D. vytvořeny další modely pro počítání odhadu věku odlišné od polského modelu, ale s použitím stejných CpG míst. Z těchto 4 modelů 2 modely (2A a 2B) vykazovaly lepší výsledky (nižší hodnoty MAD) pro oba kity než použitý polský model. Lze tedy uvažovat o navrhnutí těchto modelů firmě QIAGEN jako alternativu k polskému modelu. Bylo by ale nutné tyto modely napřed ověřit na více vzorcích s větším věkovým rozptylem (zahrnutí jedinců mladších 20 let a starších 63 let). Bylo by tedy vyžadováno testování dalších vzorků nebo by se dalo uvažovat o spolupráci s laboratořemi, které se zúčastnili mezinárodního testování (Kampmann *et al.*, 2021) nebo s laboratořemi, jejichž studie jsem v této diskusi použila (Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015; Cho *et al.*, 2017; Thong *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2019) a tyto modely aplikovat na již otestované vzorky.

Pro standardizaci systému firma QIAGEN navrhla kontrolní vzorky DNA, a sice plně methylovanou DNA, plně nemethylovanou DNA a případně jejich směs v poměru 1:1. Tyto kontrolní vzorky byly otestovány 2. verzí kitu a jejich výsledek byl srovnán mezi všemi do testování zapojenými laboratořemi (Dánsko, Německo, USA a Francie). Výsledky ale vykazovaly vysokou variabilitu určenou vysokými hodnotami SD zvláště u methylované kontrolní DNA. Proto bylo vyhodnoceno, že tyto vzorky nejsou příliš vhodné pro standardizaci systému. Tyto kontrolní DNA mají funkci kontroly účinnosti bisulfitické konverze, tím pádem mohou odhalit chybu pouze u bisulfitické konverze, ale ne u PCR amplifikace či pyrosekvence. Také jsou využívány pro více účelů (hodnocení specifity primerů pro MSP a MethyLight PCR, kvantifikační standardizace u analýzy tání s vysokým rozlišením a u MethyLight PCR, viz web QIAGEN <https://www.qiagen.com/>). Dle mého názoru by vzorky pro standardizaci systému měly mít vyšší specifitnost a také by měly obsahovat kontrolu pro PCR amplifikaci.

7. ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce byla vypracována rešerše na téma epigenetika a epigenetické mechanismy, methylace DNA a její využití ve forenzních vědách zvláště při predikci věku jedince, princip bisulfitické konverze a pyrosekvenace a dalších metod pro detekci a hodnocení methylace DNA.

Experimentální část byla zaměřena na testování 2. verze kitu PyroMark Q48 FX Age Assay od firmy QIAGEN metodou bisulfitické pyrosekvenace. Byla stanovena úroveň methylace u 5 markerů, a sice u CpG místa 7 pro *ELOVL2*, u CpG místa 1 pro *C1orf132*, u CpG místa 7 pro *TRIM59*, u CpG místa 1 pro *KLF14* a u CpG místa 2 pro *FHL2* u kontrolní DNA (methylovaná, nemethylovaná, směs 1:1) od firmy QIAGEN a u vzorků DNA vyizolovaných z periferní krve 232 dárců krve ve věku 20–63 let. 15 z těchto vzorků z periferní krve bylo analyzováno ve třech opakováních a spolu s kontrolní DNA byly jejich výsledky použity ve společném testování v rámci mezinárodní spolupráce, kterého se kromě DNA laboratoře IMTM zúčastnili 4 další forenzní laboratoře z Dánska, Francie, Německa a USA. Kontrolní DNA se ukázala nepříliš vhodná pro standardizaci systému, a to na základě srovnání procent methylací jednotlivých markerů a odhadu věku mezi všemi zapojenými laboratořemi (SD byla příliš vysoká). Naopak hodnoty procent methylace u stejného markeru u stejných vzorků u 15 testovaných vzorků v triplicátech vykazovaly poměrně nízké hodnoty SD, což ukazuje na poměrně vysokou robustnost metody.

Výsledky analýzy pro 232 jedinců byly srovnány s 1. verzí kitu, která byla testována na stejných vzorcích. Korelační analýza chronologického věku s odhadovaným věkem ukázala vyšší korelaci pro 2. verzi kitu, která vysvětlila 88,4 % věkového rozptylu ($r = 94$) než pro 1. verzi kitu, která vysvětlila pouze 79,2 % věkového rozptylu ($r = 89$). To naznačuje vyšší přesnost 2. verze kitu. To bylo potvrzeno na základě hodnot MAD, které byly $2,7\times$ nižší pro 2. verzi kitu než u 1. verze (3,21 let vs. 8,78 let). 2. verze kitu zaznamenala i nízký rozdíl v MAD mezi věkovými kategoriemi (2,95 let, 2,8 let, 2,65 let a 4,18 let), naopak u 1. verze kitu se přesnost s věkem výrazně snižovala (MAD = 3,71 let pro 20–29 let vs. MAD = 13 let pro 50–63 let).

Při srovnání korelace procent methylace s věkem bylo vyšších hodnot korelace u 2. verze kitu dosaženo pro markery *ELOVL2* ($r = 0,74$), *TRIM59* ($r = 0,7$) a *FHL2* ($r = 0,83$). Markery *C1orf132* ($r = -0,72$) a *KLF14* ($r = 0,75$) vykazovaly naopak vyšší korelaci u 1. verze kitu. Nejnižší rozdíl v korelaci mezi kity byl zaznamenán u markeru *TRIM59* ($r = 0,7$ vs.

$r = 0,68$) a nejvyšší u *ELOVL2* ($r = 0,74$ vs $r = 0,52$). Při korelační analýze methylace mezi 1. a 2. verzí kitu bylo nejvyšších hodnot dosaženo pro *KLF14* s vysvětlením 56,3 % ($r = 0,75$) variability v methylaci a nejnižší pro *ELOVL2*, u kterého hodnoty téměř nekorelovaly (pouze 11,6 % s $r = 0,34$).

Na základě procent methylace u všech 5 markerů byly vytvořeny modely 1A a 1B pro 1. verzi kitu a 2A a 2B pro 2. verzi kitu, které byly testovány na obou verzích kitu. Modely 2A (MAD 2,31 let pro 2. verzi a 7,86 let pro 1. verzi) a 2B (MAD 2,32 let pro 2. verzi a 7,77 let pro 1. verzi) vykazovaly lepší výsledky než polský model (MAD 3,21 let pro 2. verzi a 8,78 let pro 1. verzi), ale jejich přesnost se musí ověřit.

2. verze kitu vykazuje několikrát vyšší přesnost než 1. verze kitu a lze reálně uvažovat o jejím komerčním využití ve forenzní praxi.

8. LITERATURA

- ❖ Ahmadian A., Ehn M., Hober S. (2006): Pyrosequencing: History, biochemistry, and future. *Clinica Chimica Acta* 363: 83–94.
- ❖ Applied Biosystems (2008): SOLiD System: The SOLiD generation delivers. [online] [navštíveno 8.11.2020] Dostupné z: http://www.columbia.edu/cu/biology/courses/w3034/Dan/readings/SOLiD_System_Brochure.pdf
- ❖ Bacalini M. G., Deelen J., Pirazzini C., De Cecco M., Giuliani C., Lanzarini C., Ravaioli F., Marasco E., van Heemst D., Suchiman H., Sliker R., Giampieri E., Recchioni R., Marcheselli F., Salvioli S., Vitale G., Olivieri F., Spijkerman A., Dollé M. E. T., ... Garagnani, P. (2017): Systemic Age-Associated DNA Hypermethylation of ELOVL2 Gene: In Vivo and In Vitro Evidences of a Cell Replication Process. *The Journals of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 72(8): 1015–1023.
- ❖ Baccarelli A., Bollati, V. (2009): Epigenetics and environmental chemicals. *Current Opinion in Pediatrics* 21(2): 243–251.
- ❖ Bartošík M., Ondroušková E. (2016): Nové metody studia metylace DNA – MS-HRM analýza a elektrochemie. *Klinická Onkologie* 29(4): 64–71.
- ❖ Bassil C. F., Huang Z., Murphy S. K. (2013): Bisulfite Pyrosequencing. In: Malek A., Tchernitsa O. (ed.): *Ovarian Cancer*, pp. 95–107, Humana Press, Totowa, NJ.
- ❖ Beikircher G., Pulverer W., Hofner M., Noehammer C., Weinhaeusel A. (2017): Multiplexed and Sensitive DNA Methylation Testing Using Methylation-Sensitive Restriction Enzymes “MSRE-qPCR.” In: Tost J. (ed.): *DNA Methylation Protocols*, pp. 407–424, Humana Press, New York, NY.
- ❖ Behjati S., Tarpey P. S. (2013): What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood – Education and Practice* 98: 236–238.
- ❖ Bekaert B., Kamalandua A., Zapico S. C., de Voorde W. V., Decorte R. (2015): Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics* 10(10): 922–930.
- ❖ Bentley D., Balasubramanian S., Swerdlow H., Smith G. P., Milton J., Brown C. G., Hall K. P., Evers D. J., Barnes C. L., Bignell H. R., Boutell J. M., Bryant J., Carter R. J., Cheetham R. K., Cox A. J., Ellis D. J., Flatbush M. R., Gormley N. A., Humphray S. J., ... Smith A. J. (2008): Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456: 53–59.

- ❖ Biovectis The age estimation calculator [online] [navštíveno 6.3.2021] Dostupné z <http://biovectis.com/forensic1/age-calculator>
- ❖ Bogdanović O., Veenstra G. J. C. (2009): DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* 118(5): 549–565.
- ❖ Bologna J. L., Jorizzo J. L., Rapini R. P. (2008): *Dermatology*. Elsevier, Spain.
- ❖ Coco C., Sgarra L., Potenza M. A., Nacci C., Pasculli B., Barbano R., Parrella P., Montagnani M. (2019): Can Epigenetics of Endothelial Dysfunction Represent the Key to Precision Medicine in Type 2 Diabetes Mellitus? *International Journal of Molecular Science* 20(12): 29–49.
- ❖ Davis Ch. P., Stöppler M. C. (2020): Polymerase Chain Reaction (PCR) Test. eMedicineHealth. [online] [navštíveno 3.4.2020] Dostupné z https://www.emedicinehealth.com/pcr_polymerase_chain_reaction_test/article_em.htm
- ❖ Deamer D., Akeson M., Branton, D. (2016): Three decades of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology* 34(5): 518–524.
- ❖ Delaney C., Garg S. K., Yung, R. (2015): Analysis of DNA Methylation by Pyrosequencing. *Methods in Molecular Biology*, 249–264.
- ❖ Diggle M. A., Clarke S. C. (2003): A Novel Method for Preparing Single-Stranded DNA for Pyrosequencing™. *Molecular Biotechnology* 24(2): 221–224.
- ❖ Eid J., Fehr A., Gray J., Luong K., Lyle J., Otto G., Peluso P., Rank D., Baybayan P., Bettman B., Bibillo A., Bjornson K., Chaudhuri B., Christians F., Cicero R., Clark S., Dalal R., Dewinter A., Dixo, J., ... Turner S. (2009): Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science* 323: 133–138.
- ❖ Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones, P. A. (2004): Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429(6990): 457–463.
- ❖ Fakhrai-Rad H., Pourmand N., Ronaghi M. (2002): Pyrosequencing™: An Accurate Detection Platform for Single Nucleotide Polymorphisms. *Human Mutation* 19(5): 479–485.
- ❖ 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 USA* 89: 1827–1831.
- ❖ Garagnani P., Bacalini M. G., Pirazzini C., Gori D., Giuliani C., Mari D., Di Blasio A. M., Gentilini D., Vitale G., Collino S., Rezzi S., Castellani G., Capri M., Salvioli S., Franceschi C. (2012): Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age. *Aging Cell* 11(6): 1132–1134.

- ❖ Garibyan L., Avashia N. (2013): Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* 133(3): 1–4.
- ❖ Gatew H., Tarekegn G. M. (2018): Next-generation sequencing platforms for latest livestock reference genome assemblies. *African Journal of Biotechnology* 17(39): 1232–1240.
- ❖ Goldberg A. A. (2019): A Brief History of PCR and Its Derivatives. *International Labtag*. [online] [navštíveno 3.4.2020] Dostupné z <https://blog.labtag.com/a-brief-history-of-pcr-and-its-derivatives>
- ❖ Grada A., Weinbrecht K. (2013): Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *Journal of Investigative Dermatology* 133(8): 1–4.
- ❖ Guerrero-Bosagna C. (2013): DNA Methylation. *Materials and Methods* 2013(3): 206.
- ❖ Gupta N., Verma V. (2019): Next-Generation Sequencing and Its Application: Empowering in Public Health Beyond Reality. In Parora A. K., eds. *Microbial Technology for the Welfare of Society* pp. 313–341, Springer Nature Singapore.
- ❖ 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., Ideke, T., Zhang K. (2013): Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Molecular Cell* 49(2): 359–367.
- ❖ Heyn H., Li N., Ferreira H. J., Moran S., Pisano D. G., Gomez A., Diez J., Sanchez-Mut J. V., Setien F., Carmona F. J., Puca A. A., Sayols S., Pujana M. A., Serra-Musach J., Iglesias-Platas I., Formiga F., Fernandez A. F., Fraga M. F., Heath S. C., ... Esteller M. (2012): Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109: 10522–10527.
- ❖ Higuchi R., Gyllensten U., Persing D. H. (2011): Next-generation DNA sequencing and microbiology. In: Persing D. H., Tenover F. C., Tang Y-W., Nolte F.S., Hayden R.T., van Belkum A., eds. *Molecular microbiology. diagnostic, principles and practice*, pp. 301–312, ASM Press, Washington DC.
- ❖ Hofner M., Krainer J., Pabinger S., Pulverer W., Nöhammer C., Weinhäusel, A. (2020): Multiplex analyses using methylation sensitive restriction enzyme qPCR. In: Tollefsbol T. (ed.): *Epigenetics Methods*, pp. 181–212, Academic Press 2020.
- ❖ Horvath S. (2013): DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology* 14(10): 31–56.
- ❖ Horvath S., Raj K. (2018): DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nature Reviews Genetics* 19(6): 371–384.

- ❖ 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.
- ❖ Illumina [online] [navštíveno 20.4.2021] Dostupné z <https://www.illumina.com/>
- ❖ Issa J. P. (2014): Aging and epigenetic drift: a vicious cycle. *The Journal of Clinical Investigation* 124(1): 24–29.
- ❖ Jin B., Li Y., Robertson K. D. (2011): DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? *Genes & Cancer* 2(6): 607–617.
- ❖ Jung S. E., Lim S. M., Hong S. R., Lee E. H., Shin K. J., Lee H. Y. (2019): DNA methylation of the ELOVL2, FHL2, KLF14, C1orf132/MIR29B2C, and TRIM59 genes for age prediction from blood, saliva, and buccal swab samples. *Forensic Science International: Genetics* 38 1–8.
- ❖ Kader F., Ghai M. (2015): DNA methylation and application in forensic sciences. *Forensic Science International* 249: 255–265.
- ❖ Kampmann M.-L., Børsting C., Drabek J., Papin J., Gauthier Q., Fleckhaus J., McCord B., Schneider P. M., Morling N. (2021): Collaborative exercise: Analysis of age estimation using the AgePlex kit and the PyroMark Q48 platform – teprve připravované, Corresponding author: Marie-Louise Kampmann, forensic.genetics@sund.ku.dk.
- ❖ Karimi M., Johansson S., Stach D., Corcoran M., Grandér D., Schalling M., Bakalkin G., Lyko F., Larsson C., Ekström, T. J. (2006): LUMA (LUminometric Methylation Assay) – A high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation. *Experimental Cell Research* 312(11): 1989–1995.
- ❖ Krishna B. M., Khan M. A., Khan S. T. (2019): Next-Generation Sequencing (NGS) Platforms: An Exciting Era of Genome Sequence Analysis. In: Tripathi V., Kumar P., Tripathi, P., Kishore A., Kamle, M. (ed). (2019). *Microbial Genomics in Sustainable Agroecosystems*, pp. 89–109, Springer Singapore.
- ❖ Kundu S., Das R., Laskar S., Choudhury Y., Ghosh S. K. (2020): Principles of bi-sulfite conversion of DNA and methylation-specific PCR (MSP) in biological research. In: Tollefsbol T. (ed.): *Epigenetics Methods*, pp. 17–36, Academic Press 2020.
- ❖ Kuo K. C., McCune R. A., Gehrke C. W., Midgett R., Ehrlich M. (1980): Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA. *Nucleic Acids Research* 8(20): 4763–4776.
- ❖ Kurdyukov S., Bullock M. (2016): DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method *Biology* 5(1): 3.

- ❖ Lisanti S., Omar W. A., Tomaszewski B., de Prins S., Jacobs G., Koppen G., Mathers J. C., Langie S. A. (2013): Comparison of methods for quantification of global DNA methylation in human cells and tissues. *PLoS ONE* 8: 3.
- ❖ Maegawa S., Hinkal G., Kim H. S., Shen L., Zhang L., Zhang J., Zhang N., Liang S., Donehower L. A., Issa J. P. (2010): Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Research* 20(3): 332–340.
- ❖ Margulies M., Egholm M., Altman W. E., Attiya S., Bader J. S., Bemben L. A., Berka J., Braverman M. S., Chen Y.-J., Chen Z., Dewell S. B., Du L., Fierro J. M., Gomes X. V., Godwin B. C., He W., Helgesen S., Ho Ch. H., Irzyk G. P., ... Rothberg J. M. (2005): Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376–380.
- ❖ Masopust J. (2010): Epigenetické alterace a jejich klinický význam. *Labor Aktuell* 02(10): 4–7.
- ❖ Moelans C. B., Atanesyan L., Savola S. P., van Diest P. J. (2017): Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA). In: Tost J. (ed.): *DNA Methylation Protocols*, pp. 537–549, Humana Press, New York, NY.
- ❖ Montpetit A. J., Alhareeri A. A., Montpetit M., Starkweather A. S., Elmore L. W., Filler K., Mohanraj L., Burton C. W., Menzies V. S., Lyon D. E., Jackson-Cook C. K. (2014): Telomere Length, *Nursing Research* 63(4): 289–299.
- ❖ Moore L. D., Le T., Fan G. (2012): DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology* 38(1): 23–38.
- ❖ Nourizad N. (2004): *Recombinant Enzymes in Pyrosequencing Technology*. Disertační práce. Royal Institute of Technology, Department of Biotechnology, Stockholm, Sweden.
- ❖ Nyrén P. (2007): The History of Pyrosequencing (®). *Methods in Molecular Biology* 373: 1–14.
- ❖ Parson W. (2018): Age Estimation with DNA: From Forensic DNA Fingerprinting to Forensic (Epi)Genomics: A Mini-Review. *Gerontology* 64(4): 326–332.
- ❖ QIAGEN. [online] [navštíveno 24.2.2021] Dostupné z <https://www.qiagen.com>
- ❖ Rakyan V. K., Down T. A., Maslau S., Andrew T., Yang T. P., Beyan H., Whittaker P., McCann O. T., Finer S., Valdes A. M., Leslie R. D., Deloukas P., Spector, T. D. (2010): Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Research* 20(4): 434–439.

- ❖ 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: 193.
- ❖ Ronaghi M. (2001): *Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 11: 3–11.
- ❖ Ronaghi M., Uhlén M., Nyrén, P. (1998): A sequencing method based on real-time pyrophosphate detection. *Science* 281: 363–365.
- ❖ Rothberg J., Hinz W., Rearick T., Schultz J., Mileski W., Davey M., Leamon J. H., Johnson K., Milgrew M. J., Edwards M., Hoon J., Simons J. F., Marran D., Myers J. W., Davidson J. F., Branting A., Nobile J. R., Puc B. P., Light D., ... Bustillo J. (2011): An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475: 348–352.
- ❖ Salameh Y., Bejaoui Y., El Hajj N. (2020): DNA Methylation Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. *Frontiers in Genetics* 11: 171.
- ❖ Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(12): 5463–5467.
- ❖ Shen L., Waterland, R. A. (2007): Methods of DNA methylation analysis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 10(5): 576–581.
- ❖ Shuikan A., Alharbi S. A., Alkhalifah D. H. M., Hozzein W. N. (2019): High-Throughput Sequencing and Metagenomic Data Analysis. In: Hozzein W. N. (ed.): *Metagenomics Basics, Methods and Applications*, IntechOpen, London, Rijeka.
- ❖ Schneider G. F., Dekker, C. (2012): DNA sequencing with nanopores. *Nature Biotechnology* 30(4): 326–328.
- ❖ Snustad D. P., Simmons M. J., Relichová J. (2009): *Genetika (z anglického originálu Principles of Genetics)*. Masarykova univerzita, Brno.
- ❖ So M. Y., Tian Z., Phoon Y. S., Sha S., Antoniou M. N., Zhang J., Wu R. S., Tan-Un K. C. (2014): Gene expression profile and toxic effects in human bronchial epithelial cells exposed to zearalenone. *PloS One* 9(5): e96404.
- ❖ Song L., James S. R., Kazim L., Karpf A. R. (2005): Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 77: 504–510.
- ❖ Spólnicka M., Pośpiech E., Pepłońska B., Zbieć-Piekarska R., Makowska Ż., Pięta A., Karłowska-Pik J., Ziemkiewicz B., Wężyk M., Gasperowicz P., Bednarczuk T., Barcikowska M., Żekanowski C., Płoski R., Branicki, W. (2018): DNA methylation in

- ELOVL2 and C1orf132 correctly predicted chronological age of individuals from three disease groups. *International Journal of Legal Medicine* 132(1): 1–11.
- ❖ Staněk D. (2015): RNA – temná hmota v našich buňkách. Z edice Věda kolem nás, Co to je... Ústav molekulární genetiky Akademie věd ČR, v. v. i. Nakladatelství Academia, Praha.
 - ❖ Sukawutthiya P., Sathirapatya T., Vongpaisarnsin K. (2021): A minimal number CpGs of ELOVL2 gene for a chronological age estimation using pyrosequencing. *Forensic Science International* 318: 110631.
 - ❖ 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.
 - ❖ Teschendorff A. E., West J., Beck S. (2013): Age-associated epigenetic drift: implications, and a case of epigenetic thrift? *Human Molecular Genetics* 22(1): 7–15.
 - ❖ 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: 249–251.
 - ❖ Van Dijk E. L., Auger H., Jaszczyszyn Y., Thermes, C. (2014): Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics* 30(9): 418–426.
 - ❖ Vidaki A., Kayser M. (2017): From forensic epigenetics to forensic epigenomics: broadening DNA investigative intelligence. *Genome Biology* 18: 23–28
 - ❖ Virkler K., Lednev I. K. (2009): Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Science International* 188(1-3): 1–17.
 - ❖ Vyskot B. (2010): *EpiGenetika*. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Olomouc.
 - ❖ Williams G. (2018): The emerging field of forensic epigenetics. *Forensic Science International* 290: 24–25.
 - ❖ Yong W. S., Hsu F. M., Chen P. Y. (2016): Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics & Chromatin* 9:26.
 - ❖ Yu M., Hon G. C., Szulwach K. E., Song C. X., Zhang, L., Kim A., Li, X., Dai Q., Shen Y., Park B., Min J. H., Jin P., Ren B., He C. (2012): Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. *Cell* 149(6): 1368–1380.

- ❖ Yu Y., Blair S., Gillespie D., Jensen R., Myszkowski D., Badran A. H., Ghosh I., Chagovetz A. (2010): Direct DNA Methylation Profiling Using Methyl Binding Domain Proteins. *Analytical Chemistry* 82(12): 5012–5019.
- ❖ Zbieć-Piekarska R., Spólnicka M., Kupiec T., Parys-Proszek A., Makowska Ż., Pałeczka 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.
- ❖ Zhu C., Utsunomiya T., Ikemoto T., Yamada S., Morine Y., Imura S., Arakawa Y., Takasu C., Ishikawa D., Imoto I., Shimada M. (2014): Hypomethylation of Long Interspersed Nuclear Element-1 (LINE-1) is Associated with Poor Prognosis via Activation of c-MET in Hepatocellular Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology* 21(S4): 729–735.
- ❖ Zapico S. C., Ubelaker D. H. (2016): Relationship between mitochondrial DNA mutations and aging: estimation of age-at-death. *The Journals of Gerontology* 71(4): 445–450.
- ❖ Zolotarev A. D., Chekalin E. V., Bruskin, S. A. (2019): Modern Molecular Genetic Methods for Age Estimation in Forensics. *Russian Journal of Genetics* 55(12): 1460–1471.

9. PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Sekvence forward a reverse primerů pro PCR amplifikaci a sekvenačních primerů pro pyrosekvenování u příslušných genů.

Příloha č. 2: Kompletní seznam hodnot procent methylace u všech pěti markerů (*ELOVL2*, *C1orf132*, *TRIM59*, *KLF14*, *FHL2*) včetně hodnocení kvality výsledků u 230 dárců krve testovaných ve 2) a 3) části experimentální části diplomové práce.

Příloha č. 3: Odhadovaný věk stanovený 2. verzí kitu (testováno mnou) a 1. verzí kitu (testováno Mgr. Jurtíkovou) a chronologický věk u 230 dárců krve testovaný pomocí PyroMark Q48 FX Age Assay kitu.

Příloha č. 1: Sekvence forward a reverse primerů pro PCR amplifikaci a sekvenačních primerů pro pyrosekvenování u příslušných genů.

příslušný gen	typ primeru	sekvence
<i>ELOVL2</i>	forward	AGGGGAGTAGGGTAAGTGAG
	reverse (biotinylovaný)	CAACCAATAAATATTCCTAAAACCTCC
	sekvenační	GGGAGGAGATTTGTAGGTTT
<i>C1orf132</i>	forward	GGGGGTTAAGTTATTAAGTTTTGAAGTT
	reverse (biotinylovaný)	ATTTAATAAAAACCAAATTCTAAAACAT
	sekvenační	TGAAGTTAGTAGGATTATTTAT
<i>TRIM59</i>	forward	GTGTGGAGTTAAGTAAAAGATAATT
	reverse (biotinylovaný)	ATAATCTAAAAAAAACCTAAACCTAA
	sekvenační	AAGTAAAAGATAATTTTTTAGAAGT
<i>KLF14</i>	forward	GGTTTTAGGTTAAGTTATGTTTAATAGTT
	reverse (biotinylovaný)	AAAATTTCCCTCTATTACCATTACCTAACT
	sekvenační	ATAGTTTTAGAAATTATTTTGTTTT
<i>FHL2</i>	forward	GTTTTTAGGGTTTTGGGAGTATAGTAGTT
	reverse (biotinylovaný)	TAAACAAACCCCTACCACC
	sekvenační	GTTTTGGGAGTATAGTAGTTA

Příloha č. 2: Kompletní seznam hodnot procent methylace u všech pěti markerů (*ELOVL2*, *C1orf132*, *TRIM59*, *KLF14*, *FHL2*) u 232 dárců krve testovaných ve 2) a 3) části experimentální části diplomové práce pro oba kity.

vzorek	<i>ELOVL2</i> (C7)		<i>C1orf132</i> (C1)		<i>TRIM59</i> (C7)		<i>KLF14</i> (C1)		<i>FHL</i> (C2)	
	kit1	kit2	kit1	kit2	kit1	kit2	kit1	kit2	kit1	kit2
18-1494-DG-4916 (CZG 285)	56	68	71	53	35	37	6	6	29	41
18-1233-DG-4398 (CZG 186)	66	64	46	38	44	49	9	9	46	49
18-1807-DG-5246 (CZG 431)	66	70	63	51,5	37	38,5	6	4	36	40
18-2574-DG-6144 (CZG 625)	56,5	60	66,5	54	28	32	6,5	5	30,5	30
18-1146-DG-4263 (CZG 149)	66	77	59,5	45,3	47	49,7	8,5	8	40,5	37,7
18-2203-DG-5714 (CZG 520)	56	70	68	48	38	32	6	3	30	45
18-2492-DG-6061 (CZG 602)	52	72	54	51	27	42	10	6	34	39
18-0994-DG-4079 (CZG 58)	50	64	68	56	29	26	5	6	30	32
18-1738-DG-5173 (CZG 406)	46	75	58	47	40	42	9	9	37	43
18-1917-DG-5374 (CZG 446)	56	26	63	31	34	48	6	14	27	35
19-0160-DG-6616 (CZG 703)	57	66	58	55	35	44	7	5	23	39
18-1017-DG-4105 (CZG 78)	58,5	55	72,5	61	33,5	27	4	5	28,5	34
18-1540-DG-4964 (CZG 308)	57	49	60	51	31	47	8	5	24	36
18-2487-DG-6053 (CZG 597)	52	68	68	59	27	36	6	5	29	36
19-0135-DG-6587 (CZG 681)	57	54	82,5	71	38	32	6,5	5	35,5	31
19-0157-DG-6613 (CZG 699)	68	53	49	21	35	51	8,5	7	43	38
18-0975-DG-4058 (CZG 40)	59	78	52	36	32	51	7	6	31	41
18-1092-DG-4205 (CZG 109)	53	68	65	59	36	36	6	5	24	33
18-1101-DG-4214 (CZG 115)	62	73	46	45,3	33	41,3	9	8,3	20	43,7
18-1423-DG-4828 (CZG 255)	63	55	68,5	34	40	48	5,5	5	28	40

vzorek	ELOVL2 (C7)		C1orf132 (C1)		TRIM59 (C7)		KLF14 (C1)		FHL (C2)	
	kit1	kit2	kit1	kit2	kit1	kit2	kit1	kit2	kit1	kit2
18-1424-DG-4829 (CZG 256)	58	75	52	45	36	41	9	8	29	39
18-1687-DG-5119 (CZG 369)	53	56	66	61	26	30	4	3	21	28
18-1939-DG-5389 (CZG 457)	75,5	73	49	40	44	43	14,5	10	40	37
18-1078-DG-4188 (CZG 99)	75	61	57	52	29	36	5	4	27	37
18-2555-DG-6127 (CZG 610)	66,5	63	69,5	54	41,5	37	10,5	5	42,5	36
18-2576-DG-6146 (CZG 627)	63	71	51	42	35	38	10	7	34	48
18-0962-DG-4056 (CZG 28)	58	77	56	50	32	33	8	7	34	37
18-1026-DG-4114 (CZG 85)	62	65	68	62	33	51	8	7	37	49
18-1171-DG-4294 (CZG 169)	59	78	49	51	39	37	7	6	45	46
18-2391-DG-5951 (CZG 570)	60	69	51	37	44	35	6	6	39	37
18-0953-DG-4034 (CZG 19)	56	66	68	50	32	29	7	6	33	35
18-1091-DG-4204 (CZG 108)	53,5	51	79	63	30,5	27	6	6	33,5	32
18-1118-DG-4231 (CZG 129)	61	73,5	38,5	49	30,5	36	9	8	32,5	37,5
18-1126-DG-4240 (CZG 135)	59	70	47	39	49	38	5	6	41	38
18-1300-DG-4513 (CZG 202)	61	66	67	45	35	35	6	8	40	38
18-2177-DG-5688 (CZG 511)	57	72	41	39	45	40	9	7	38	38
18-2208-DG-5719 (CZG 525)	49	51	68	44	32	20	4	6	32	31
18-2378-DG-5936 (CZG 557)	74,5	80	54,5	43	45	46	13,5	10	47	48
19-0026-DG-6473 (CZG 671)	56	64	61	45	35	40	6	6	40	45
18-1108-DG-4221 (CZG 122)	59	72	70	55	34	37	5	4	33	32
18-2196-DG-5708 (CZG 513)	54	49	74	50	36	39	6	8	34	33
18-2653-DG-6236 (CZG 648)	64	70	70,5	54	40	43	8	7	32	40
18-1522-DG-4939 (CZG 303)	69	68	52	50	46	40	8	7	43	46
18-1813-DG-5251 (CZG 437)	53	62	77	62	31	44	4	3	31	31
18-1999-DG-5456 (CZG 470)	62	72	67	50	31	42	12	7	30	44
18-2396-DG-5956 (CZG 575)	58	66	62	47	39	40	8	9	39	39
18-2425-DG-5991 (CZG 592)	70,5	74	50,5	37	41,5	48	15,5	12	35,5	46
18-0963-DG-4043 (CZG 29)	61	71	58	45	42	49	6	8	43	42
18-1454-DG-4875 (CZG 273)	54	34	77	32	30	52	5	5	31	20
18-1543-DG-4967 (CZG 311)	49	54	77,5	67	29	34	3,5	4	28	29
18-1614-DG-5040 (CZG 330)	64	60	64	49	34	39	6	10	32	36
18-1657-DG-5087 (CZG 352)	59	67	62	53	37	45	5	5	36	31
18-1808-DG-5268 (CZG 432)	62	71	46	54	36	42	9,5	11	37	45
18-2009-DG-5568 (CZG 473)	53,5	58	75	60	22,5	24	3	3,3	28	32,7
18-2154-DG-5601 (CZG 498)	47	70	52,5	64	25	32	5	7	32,5	38
18-2485-DG-6051 (CZG 595)	66	70	66	62	31	35	8	5	32	32
18-2488-DG-6054 (CZG 598)	37,5	56	54	67	51,5	31	6	8	26,5	29
18-1165-DG-4288 (CZG 164)	58	65	76	60	34	34	4	3	32	33
18-1489-DG-4911 (CZG 280)	71	53	53	25	36	58	6	7	35	33
18-2010-DG-5569 (CZG 474)	55,5	56	69,5	53	26,5	27,3	4	4,3	26,5	29,3
18-2015-DG-5574 (CZG 479)	66	69	64	57	36	37	9	7	37	38
18-2558-DG-6130 (CZG 613)	62	67	57	43	34	38	8	6	42	42
18-1625-DG-5053 (CZG 334)	53,5	58	76,5	65	24,5	30	3,5	3	26,5	31
18-1664-DG-5094 (CZG 359)	56	67	57	45	35	31	7	6	41	38

vzorek	ELOVL2 (C7)		C1orf132 (C1)		TRIM59 (C7)		KLF14 (C1)		FHL (C2)	
	kit1	kit2	kit1	kit2	kit1	kit2	kit1	kit2	kit1	kit2
19-0172-DG-6628 (CZG 712)	65	71	55	46	43	42	8	5	43	44
18-0927-DG-3999 (CZG 10)	64,5	68	62	56	40	44	7,5	5	43,5	42
18-1167-DG-4290 (CZG 166)	67	77	61	45	39	45	7	8	48	43
18-1727-DG-5230 (CZG 404)	55	66	71	59	36	32	4	4	33	30
18-2395-DG-5955 (CZG 574)	59,5	66	70	60	29,5	36	6	6	31	33
18-1031-DG-4119 (CZG 90)	66	70	56	49,5	41	38	8	6	40	39,5
18-1105-DG-4218 (CZG 119)	53	67	79	67	34	32	4	3	32	29
18-1442-DG-4861 (CZG 267)	54	70	70	68	34	29	5	4	33	34
18-2384-DG-5941 (CZG 563)	54	71	52	49	36	39	5	5	38	36
18-0986-DG-4070 (CZG 51)	60	75	37	41	46	51	10	9	51	53
18-0997-DG-4082 (CZG 61)	54	78	58	56	45	44	9	6	39	43
18-1173-DG-4296 (CZG 171)	56	80	61	36	47	61	9	7	50	50
18-1333-DG-4683 (CZG 226)	57	59	79,5	67	25,5	28	4	3	26,5	27
18-1610-DG-5034 (CZG 326)	54	35	68	47	38	57	6	17	36	40
18-1937-DG-5387 (CZG 455)	63,5	63,3	44,5	39	32,5	37	5	5	35,5	37,7
18-2659-DG-6242 (CZG 654)	67	65	60,5	58	32	41	7	5	35,5	36
18-0947-DG-4030 (CZG 13)	54	60	69	61	29,5	34	4	2	34,5	31
18-0998-DG-4083 (CZG 62)	64	45	60	27	38	34	7	5	39	39
18-1016-DG-4104 (CZG 77)	58	50	56	27	33	58	5	4	42	29
18-1168-DG-4291 (CZG 167)	73	79	54,5	50	44,5	49	8	6	43	52
18-1235-DG-4400 (CZG 188)	54	68	73	63	31	33	6	6	34	36
18-1456-DG-4877 (CZG 275)	59	76,5	53	51	30	40,5	9	7	35	37
18-1490-DG-4912 (CZG 281)	58	78	58	52	43	46	9	9	42	41
18-1919-DG-5376 (CZG 448)	57	69	58	45	40	39	7	6	36	38
18-2168-DG-5680 (CZG 502)	57	75	55	47	42	51	6	5	38	42
18-2204-DG-5715 (CZG 521)	63	77	46	48	40	43	7	6	39	45
18-2559-DG-6131 (CZG 614)	64	73	64	56	32	37	8	7	35	34
18-1094-DG-4207 (CZG 111)	56	58,7	71	55,7	26	30,3	4	3,3	30	22,7
18-1507-DG-4930 (CZG 294)	56,5	25	74,5	15	25,5	28	4,5	5	25,5	23
18-2014-DG-5573 (CZG 478)	67	76	54	46	43	44	7	7	43	43
18-2201-DG-5713 (CZG 518)	61	70	62	54	34	43	9	8	37	40
19-0030-DG-6477 (CZG 674)	61	65	60	57	35	43	5	4	32	34
18-0958-DG-4039 (CZG 24)	65	75	50	48	39	46	10	10	39	42
18-1107-DG-4220 (CZG 121)	50	65	67	57	32	33	5	3	27	32
18-1419-DG-4824 (CZG 251)	57	70	64	55	35	42	7	4	36	37
18-1662-DG-5092 (CZG 357)	54	76	48	37	37	39	10	7	43	43
18-1688-DG-5120 (CZG 370)	55	64	68	60	35	38	6	4	31	31
18-1719-DG-5222 (CZG 396)	61	68	67	56	37	36	6	4	31	31
18-1809-DG-5247 (CZG 433)	63	73	55	44	36	38	10	8	37	44
18-1914-DG-5372 (CZG 443)	49	45,7	51	31,7	28	29,3	4	2,7	29	27,7
18-2411-DG-5974 (CZG 581)	67	76	57	48	52	57	11	8	50	48
18-2609-DG-6181 (CZG 638)	57	73	62	50	29	27	6	7	32	32
19-0138-DG-6590 (CZG 684)	71	73	57	49	35	40	8	6	38,5	39
18-0969-DG-4049 (CZG 35)	67	77	53,5	51	36,5	39	7,5	7	44,5	47

vzorek	ELOVL2 (C7)		C1orf132 (C1)		TRIM59 (C7)		KLF14 (C1)		FHL (C2)	
	kit1	kit2	kit1	kit2	kit1	kit2	kit1	kit2	kit1	kit2
18-1067-DG-4175 (CZG 93)	53,5	34	71,5	33	31,5	55	3,5	5	31,5	17
18-1254-DG-4489 (CZG 196)	54	75	59	61	38	43	11	4	42	45
18-1339-DG-4689 (CZG 232)	58	70	60	55	36	37	6	6	36	38
18-1526-DG-4943 (CZG 307)	50	55	72	63	27	30	4	4	26	28
18-1547-DG-4971 (CZG 315)	53	68	62	54	27	28	4	4	28	29
18-1632-DG-5060 (CZG 341)	53	67	62	54	35	58	7	5	36	36
18-2018-DG-5577 (CZG 482)	59	66	64	22	30	50	10	7	35	17
19-0138-DG-6591 (CZG 685)	65	70	65	60	43	48	10	14	39	40
18-1147-DG-4264 (CZG 150)	60	69	62	48,5	32	37,5	7	6,5	35	34,5
18-1718-DG-5221 (CZG 395)	46	65	67	46	26	28	4	4	28	28
18-1747-DG-5182 (CZG 415)	64	71	63	49	41	40	8	7	41	42
18-2229-DG-5748 (CZG 539)	54	65	74	56	34	34	5	3	31	31
18-2234-DG-5784 (CZG 544)	56	73	71	61	36	33	5	5	32	33
18-2367-DG-5918 (CZG 553)	54	78	58	53	37	37	9	7	35	39
18-2422-DG-5988 (CZG 589)	64	76	50	47	33	39	9	5	39	41
18-1174-DG-4297 (CZG 172)	56	65	71	62	34	31	4	3	39	36
18-1427-DG-4832 (CZG 258)	59	74	63	52	40	35	6	3	37	39
18-1933-DG-5383 (CZG 451)	47	64	74	65	29	30	5	2	35	32
18-2709-DG-6294 (CZG 657)	59	76	62	57	40	53	7	6	41	40
19-0138-DG-6592 (CZG 686)	57	55	78	63	31	31	5	4	35	42
18-0920-DG-3992 (CZG 4)	55	71	55	44	39	39	6	4	33	38
18-0990-DG-4075 (CZG 54)	57	42	59	49	38	42	6	15	40	43
18-1096-DG-4209 (CZG 112)	58	67	57	53	41	47	7	7	41	45
18-1403-DG-4807 (CZG 238)	63	78	45	39	43	44	13	9	48	45
18-1023-DG-4111 (CZG 82)	56	77	46	40	40	39	8	7	37	47
18-1301-DG-4514 (CZG 203)	39	74	45	57	35	46	7	6	23	37
18-2011-DG-5570 (CZG 475)	49	67	12	52	25	33	8	5	29	43
18-2080-DG-5584 (CZG 484)	47	66	44	56	28	37	7	4	32	38
19-0156-DG-6612 (CZG 698)	53	73	52,5	44	32,5	35	6,5	6	28,5	41
18-0959-DG-4040 (CZG 25)	42	61	55	61	28	28	5	4	24	36
18-1030-DG-4118 (CZG 89)	47	22	68	23	31	25	4	5	29	9
18-1139-DG-4256 (CZG 144)	59	73	43	52	39	39	4	4	32	40
18-1251-DG-4482 (CZG 193)	44	79	41,5	33	44,5	49	6	5	34,5	51
18-1616-DG-5042 (CZG 332)	38	72,3	12	61	27	37,7	6	5,7	23	39
18-1665-DG-5095 (CZG 360)	38	71	34	45	33	39	5	7	30,5	39
18-1691-DG-5123 (CZG 373)	40,5	73	54,5	46	43,5	45	6,5	7	37,5	46
18-1704-DG-5136 (CZG 386)	55	73	44	35	47	39	7	7	40	41
18-2231-DG-5774 (CZG 541)	48	56	76	69	30	23	5	3	27	30
18-2652-DG-6235 (CZG 647)	51	67	71	66	32	34	7	5	27	27
18-1008-DG-4096 (CZG 69)	57	71	62	55	35	32	6	4	35	41
18-1552-DG-4975 (CZG 320)	50	67	64	64	31	28	5	3	30	31
18-1740-DG-5175 (CZG 408)	49	73	63	51	35	35	7	3	33	34
18-2175-DG-5690 (CZG 509)	47	59	63	67	33	30	4	3	30	27
18-2387-DG-5944 (CZG 566)	50	64	68	59	38	36	4	3	30	35

vzorek	ELOVL2 (C7)		C1orf132 (C1)		TRIM59 (C7)		KLF14 (C1)		FHL (C2)	
	kit1	kit2	kit1	kit2	kit1		kit1	kit2	kit1	kit2
18-2409-DG-5972 (CZG 579)	53,5	72	59	47	42,5	43	9,5	8	39	43
18-2743-DG-6328 (CZG 668)	58	70	63	55	36	35	7	5	35	40
19-0215-DG-6673 (CZG 714)	50	65,5	68	51,5	30	34	6	4,5	32	39,5
18-0992-DG-4077 (CZG 56)	50,5	82	53,5	46	45,5	49	9	8	41,5	52
18-1002-DG-4087 (CZG 66)	42	59	67	63	30	30	4	4	28	30
18-1068-DG-4176 (CZG 94)	53	62	64	53	36	42	4	4	37	36
18-1636-DG-5064 (CZG 345)	50	66	63	56	33	38	4	4	33	33
18-2152-DG-5599 (CZG 496)	44	65	66	62	32	36	6	5	28	31
18-2608-DG-6180 (CZG 637)	49	71	62	54	35	38	6	5	38	38
18-2658-DG-6241 (CZG 653)	53	69	70	58	33	30	6	4	36	35
18-0982-DG-4066 (CZG 47)	50	57,7	62	45	32	34,7	5	6	33	33,7
18-1155-DG-4278 (CZG 156)	52	63,7	73	57,7	28	29,7	5	4,7	31	33,7
18-1412-DG-4816 (CZG 247)	55	74	63	55	38	41	8	7	38	37
18-1512-DG-4944 (CZG 296)	51	76	58	53	39	42	6	4	39	39
18-1651-DG-5080 (CZG 348)	50	72	68	68	35	37	5	5	35	34
18-1154-DG-4277 (CZG 155)	61	64	63	57	36	33	6	5	28	30
18-1724-DG-5227 (CZG 401)	54	74	59	55	36	37	8	7	32	33
19-0031-DG-6478 (CZG 675)	54	63	73	63	28	32	7	5	28	30
18-0924-DG-3996 (CZG 8)	58	78	54	44	45	46	12	9	39	40
18-1695-DG-5127 (CZG 377)	52	63	72	63	34	38	5	4	30	30
18-2207-DG-5718 (CZG 524)	52	67	68	60	33	34	6	5	27	33
18-2551-DG-6123 (CZG 606)	45	61	73	65	26	26	5	3	28	31
18-0988-DG-4073(CZG-52)	55	68	65	58	30	32	7	6	34	32
18-0995-DG-4080 (CZG 59)	62	71	61	52	36	41	10	9	37	40
18-1079-DG-4189 (CZG 100)	46	60	61	66	40	31	5	2	25	26
18-1090-DG-4203 (CZG 107)	55	76,5	48	49	38	38	8	7,5	26	36
18-1138-DG-4255 (CZG 143)	54	69	54	52	32	36	6	5	28	32
18-1797-DG-5236 (CZG 421)	52	72	62	61	36	40	8	7	32	36
18-2222-DG-5738 (CZG 535)	54	73	52	46	30	34	6	4	33	35
18-0949-DG-4054 (CZG 15)	49	69	54	50	30	32	8	6	33	37
18-1014-DG-4102 (CZG 75)	44	61	63	54	31	30	5	4	29	30
18-1081-DG-4191 (CZG 102)	57	79	51,5	40	41	48	10,5	10	41,5	49
18-1304-DG-4517 (CZG 206)	51	66	58	53	27	28	9	6	27	30
18-1453-DG-4874 (CZG 272)	58	73	63	57	31	37	6	6	33	38
18-2716-DG-6324 (CZG 664)	47	62	66	72	31	35	5	4	28	27
18-0956-DG-4037 (CZG 22)	48	60	64	50	41	40	4	4	28	30
18-1022-DG-4110 (CZG 81)	46	62	57	64	28	32	6	6	32	41
18-1121-DG-4235 (CZG 130)	55	74	55	53	36	39	11	9	41	45
18-1159-DG-4282 (CZG 160)	55	69	57	55	39	42	9	9	37	37
18-1802-DG-5241 (CZG 426)	53	68	53	48	33	36	8	6	35	39
18-2178-DG-5689 (CZG 512)	52	70	44	50	31	36	6	6	31	34
18-2408-DG-5971 (CZG 578)	56	78	52	43	41	42	10	9	46	46
19-0138-DG-6593 (CZG 687)	50	65,3	64	56	27	29,7	4	3,7	29	32,7
19-0162-DG-6618 (CZG 701)	49	64	59	54	32	34	5	3	28	31

vzorek	ELOVL2 (C7)		C1orf132 (C1)		TRIM59 (C7)		KLF14 (C1)		FHL (C2)	
	kit1	kit2	kit1	kit2	kit1	kit2	kit1	kit2	kit1	kit2
18-0980-DG-4064 (CZG 45)	48	60	61	69	30	29	4	4	25	27
18-1000-DG-4085 (CZG 64)	49	62	67	64	29	31	6	5	33	33
18-1069-DG-4177 (CZG 95)	48	55	66	68	31	29	3	3	28	27
18-1343-DG-4693 (CZG 236)	59	65	45	59	42	44	10	8	39	45
18-1460-DG-4882 (CZG 278)	51	60	65	56	32	39	6	5	24	29
18-1493-DG-4915 (CZG 284)	56	61	59	64	32	33	8	5	24	30
18-1520-DG-4937 (CZG 301)	59	69	59	52	29	34	7	7	31	32
18-1524-DG-4941 (CZG 305)	48	54	71	69	31	32	4	2	25	28
18-1932-DG-5382 (CZG 450)	49	61	66	58	29	24	5	5	31	30
18-2660-DG-6243 (CZG 655)	57	79	55,5	40	42,5	47	16	14	33	45
18-0946-DG-4029 (CZG 12)	57	69	57	49	38	39	6	5	35	34
18-1024-DG-4112 (CZG 83)	55	73	59	50	36	40	6	5	36	35
18-1180-DG-4303 (CZG 176)	50	58	39	50	28	51	11	9	24	45
18-1417-DG-4822 (CZG 249)	57	71	58	53	34	36	6	4	37	36
18-1741-DG-5176 (CZG 409)	62	63	64	63	29	41	7	5	17	30
18-1100-DG-4213 (CZG 114)	62	74	54	50	33	40	10	6	28	42
18-1702-DG-5134 (CZG 384)	55	69	65	54	38	47	6	3	38	40
18-2610-DG-6182 (CZG 639)	54	72	48	48	37	35	6	4	42	43
18-1177-DG-4300 (CZG 175)	59	66	62	61	39	37	8	6	35	36
18-1425-DG-4830 (CZG 257)	59	74	51	46	32	34	11	8	38	42
18-1505-DG-4928 (CZG 293)	66	76	59	52	34	35	9	7	38	41
18-1801-DG-5240 (CZG 425)	54	62	66	70	29	28	6	3	28	27
18-0923-DG-3995 (CZG 7)	55	66	56	50	32	30	4	2	31	34
18-1013-DG-4101 (CZG 74)	59	80	51	46	43	47	7	7	40	48
18-1021-DG-4109 (CZG 80)	47	60	75	69	25	31	4	3	28	27
18-1182-DG-4305 (CZG 178)	56	76	46	38	42	44	11	11	40	43
18-1700-DG-5132 (CZG 382)	51	67	64	57	35	35	5	4	35	40
18-1027-DG-4115 (CZG 86)	55	67	65	65	32	35	7	6	34	37
18-1088-DG-4201 (CZG 105)	52	66	64	60	38	41	6	4	35	39
18-1608-DG-5032 (CZG 324)	59	75	54	53	42	46	8	5	39	43
18-2423-DG-5989 (CZG 590)	53	68	57	56	39	44	6	5	41	43
18-2603-DG-6175 (CZG 632)	49	57	74	72	28	34	5	3	29	35
19-0135-DG-6609 (CZG 695)	48	55,7	70	60	28	32,3	5	3,7	29	29,3
18-1329-DG-4679 (CZG 222)	60	75	50	49	39	41	9	7	41	44
18-1938-DG-5388 (CZG 456)	52	64	62	61	35	36	7	7	33	35
18-2379-DG-5947 (CZG 558)	59	69	56	56	40	35	6	5	41	44

Pozn.: Barevná výplň reprezentuje kvalitu výsledků (modrá/žlutá/červená, viz 5.1 Hodnocení analýzy pomocí PyroMark Q48 Autoprep Software). Údaje o kvalitě byli dostupné pouze pro 2. verzi kitu.

Příloha č. 3: Odhadovaný věk stanovený 2. verzí kitu (testováno mnou) a 1. verzí kitu (testováno Mgr. Jurtíkovou) a chronologický věk u vzorků DNA od 232 dárců krve testovaný pomocí PyroMark Q48 FX Age Assay kitu.

vzorek	chrono. věk	věk. sk.	odhad věku kit2	odhad věku kit1	vzorek	chrono. věk	věk. sk.	odhad věku kit2	odhad věku kit1
18-1494-DG-4916 (CZG 285)	20	20-29	31	27	18-1147-DG-4264 (CZG 150)	41	40-49	42	35
18-1233-DG-4398 (CZG 186)	21	20-29	24	19	18-1718-DG-5221 (CZG 395)	41	40-49	40	43
18-1807-DG-5246 (CZG 431)	21	20-29	21	18	18-1747-DG-5182 (CZG 415)	41	40-49	41	35
18-2574-DG-6144 (CZG 625)	21	20-29	22	19	18-2229-DG-5748 (CZG 539)	41	40-49	40	31
18-1146-DG-4263 (CZG 149)	22	20-29	26	18	18-2234-DG-5784 (CZG 544)	41	40-49	43	32
18-2203-DG-5714 (CZG 520)	22	20-29	26	17	18-2367-DG-5918 (CZG 553)	41	40-49	41	31
18-2492-DG-6061 (CZG 602)	22	20-29	22	21	18-2422-DG-5988 (CZG 589)	41	40-49	42	34
18-0994-DG-4079 (CZG 58)	23	20-29	26	21	18-1174-DG-4297 (CZG 172)	42	40-49	44	34
18-1738-DG-5173 (CZG 406)	23	20-29	19	21	18-1427-DG-4832 (CZG 258)	42	40-49	46	36
18-1917-DG-5374 (CZG 446)	23	20-29	25	23	18-1933-DG-5383 (CZG 451)	42	40-49	41	33
19-0160-DG-6616 (CZG 703)	23	20-29	28	20	18-2709-DG-6294 (CZG 657)	42	40-49	37	36
18-1017-DG-4105 (CZG 78)	24	20-29	25	22	19-0138-DG-6592 (CZG 686)	42	40-49	38	30
18-1540-DG-4964 (CZG 308)	24	20-29	26	19	18-0920-DG-3992 (CZG 4)	43	40-49	42	27
18-2487-DG-6053 (CZG 597)	24	20-29	25	22	18-0990-DG-4075 (CZG 54)	43	40-49	45	32
19-0135-DG-6587 (CZG 681)	24	20-29	25	16	18-1096-DG-4209 (CZG 112)	43	40-49	41	33
19-0157-DG-6613 (CZG 699)	24	20-29	25	19	18-1403-DG-4807 (CZG 238)	43	40-49	45	36
18-0975-DG-4058 (CZG 40)	25	20-29	24	26	18-1023-DG-4111 (CZG 82)	44	40-49	44	33
18-1092-DG-4205 (CZG 109)	25	20-29	25	17	18-1301-DG-4514 (CZG 203)	44	40-49	38	38
18-1101-DG-4214 (CZG 115)	25	20-29	27	18	18-2011-DG-5570 (CZG 475)	44	40-49	42	29
18-1423-DG-4828 (CZG 255)	25	20-29	28	23	18-2080-DG-5584 (CZG 484)	44	40-49	45	34
18-1424-DG-4829 (CZG 256)	25	20-29	28	21	19-0156-DG-6612 (CZG 698)	44	40-49	43	34
18-1687-DG-5119 (CZG 369)	25	20-29	29	24	18-0959-DG-4040 (CZG 25)	45	40-49	41	31
18-1939-DG-5389 (CZG 457)	25	20-29	28	18	18-1030-DG-4118 (CZG 89)	45	40-49	45	33
18-1078-DG-4188 (CZG 99)	26	20-29	33	21	18-1139-DG-4256 (CZG 144)	45	40-49	46	39
18-2555-DG-6127 (CZG 610)	26	20-29	34	24	18-1251-DG-4482 (CZG 193)	45	40-49	43	40
18-2576-DG-6146 (CZG 627)	26	20-29	30	23	18-1616-DG-5042 (CZG 332)	45	40-49	47	40
18-0962-DG-4056 (CZG 28)	27	20-29	28	25	18-1665-DG-5095 (CZG 360)	45	40-49	49	37
18-1026-DG-4114 (CZG 85)	27	20-29	30	23	18-1691-DG-5123 (CZG 373)	45	40-49	41	35
18-1171-DG-4294 (CZG 169)	27	20-29	30	21	18-1704-DG-5136 (CZG 386)	45	40-49	45	27
18-2391-DG-5951 (CZG 570)	27	20-29	27	22	18-2231-DG-5774 (CZG 541)	45	40-49	42	31
18-0953-DG-4034 (CZG 19)	28	20-29	34	23	18-2652-DG-6235 (CZG 647)	45	40-49	40	33
18-1091-DG-4204 (CZG 108)	28	20-29	33	22	18-1008-DG-4096 (CZG 69)	46	40-49	45	34
18-1118-DG-4231 (CZG 129)	28	20-29	33	25	18-1552-DG-4975 (CZG 320)	46	40-49	51	34
18-1126-DG-4240 (CZG 135)	28	20-29	29	22	18-1740-DG-5175 (CZG 408)	46	40-49	44	38
18-1300-DG-4513 (CZG 202)	28	20-29	29	24	18-2175-DG-5690 (CZG 509)	46	40-49	43	33
18-2177-DG-5688 (CZG 511)	28	20-29	31	24	18-2387-DG-5944 (CZG 566)	46	40-49	42	30
18-2208-DG-5719 (CZG 525)	28	20-29	25	25	18-2409-DG-5972 (CZG 579)	46	40-49	45	37
18-2378-DG-5936 (CZG 557)	28	20-29	32	22	18-2743-DG-6328 (CZG 668)	46	40-49	46	40
19-0026-DG-6473 (CZG 671)	28	20-29	25	25	19-0215-DG-6673 (CZG 714)	46	40-49	41	38
18-1108-DG-4221 (CZG 122)	29	20-29	29	29	18-0992-DG-4077 (CZG 56)	47	40-49	51	37
18-2196-DG-5708 (CZG 513)	29	20-29	32	24	18-1002-DG-4087 (CZG 66)	47	40-49	46	35

vzorek	chrono. věk	věk. sk.	odhad věku kit2	odhad věku kit1	vzorek	chrono. věk	věk. sk.	odhad věku kit2	odhad věku kit1
18-2653-DG-6236 (CZG 648)	29	20-29	34	28	18-1068-DG-4176 (CZG 94)	47	40-49	45	35
18-1522-DG-4939 (CZG 303)	30	30-39	32	23	18-1636-DG-5064 (CZG 345)	47	40-49	47	35
18-1813-DG-5251 (CZG 437)	30	30-39	30	25	18-2152-DG-5599 (CZG 496)	47	40-49	45	33
18-1999-DG-5456 (CZG 470)	30	30-39	38	28	18-2608-DG-6180 (CZG 637)	47	40-49	42	34
18-2396-DG-5956 (CZG 575)	30	30-39	34	26	18-2658-DG-6241 (CZG 653)	47	40-49	47	38
18-2425-DG-5991 (CZG 592)	30	30-39	34	22	18-0982-DG-4066 (CZG 47)	48	40-49	57	35
18-0963-DG-4043 (CZG 29)	31	30-39	35	30	18-1155-DG-4278 (CZG 156)	48	40-49	43	40
18-1454-DG-4875 (CZG 273)	31	30-39	33	23	18-1412-DG-4816 (CZG 247)	48	40-49	51	37
18-1543-DG-4967 (CZG 311)	31	30-39	35	24	18-1512-DG-4944 (CZG 296)	48	40-49	46	43
18-1614-DG-5040 (CZG 330)	31	30-39	36	19	18-1651-DG-5080 (CZG 348)	48	40-49	48	42
18-1657-DG-5087 (CZG 352)	31	30-39	32	27	18-1154-DG-4277 (CZG 155)	49	40-49	47	44
18-1808-DG-5268 (CZG 432)	31	30-39	32	24	18-1724-DG-5227 (CZG 401)	49	40-49	47	31
18-2009-DG-5568 (CZG 473)	31	30-39	37	25	19-0031-DG-6478 (CZG 675)	49	40-49	56	41
18-2154-DG-5601 (CZG 498)	31	30-39	36	26	18-0924-DG-3996 (CZG 8)	50	50-63	42	36
18-2485-DG-6051 (CZG 595)	31	30-39	34	26	18-1695-DG-5127 (CZG 377)	50	50-63	47	38
18-2488-DG-6054 (CZG 598)	31	30-39	31	24	18-2207-DG-5718 (CZG 524)	50	50-63	47	39
18-1165-DG-4288 (CZG 164)	31,3	30-39	33	26	18-2551-DG-6123 (CZG 606)	50	50-63	43	45
18-1489-DG-4911 (CZG 280)	32	30-39	34	28	18-0988-DG-4073(CZG-52)	51	50-63	51	38
18-2010-DG-5569 (CZG 474)	32	30-39	34	22	18-0995-DG-4080 (CZG 59)	51	50-63	53	56
18-2015-DG-5574 (CZG 479)	32	30-39	38	26	18-1079-DG-4189 (CZG 100)	51	50-63	48	35
18-2558-DG-6130 (CZG 613)	32	30-39	30	31	18-1090-DG-4203 (CZG 107)	51	50-63	52	39
18-1625-DG-5053 (CZG 334)	33	30-39	34	24	18-1138-DG-4255 (CZG 143)	51	50-63	41	39
18-1664-DG-5094 (CZG 359)	33	30-39	28	20	18-1797-DG-5236 (CZG 421)	51	50-63	47	30
19-0172-DG-6628 (CZG 712)	33	30-39	37	30	18-2222-DG-5738 (CZG 535)	51	50-63	48	36
18-0927-DG-3999 (CZG 10)	34	30-39	33	27	18-0949-DG-4054 (CZG 15)	52	50-63	46	33
18-1167-DG-4290 (CZG 166)	34	30-39	37	27	18-1014-DG-4102 (CZG 75)	52	50-63	47	41
18-1727-DG-5230 (CZG 404)	34	30-39	30	22	18-1081-DG-4191 (CZG 102)	52	50-63	46	36
18-2395-DG-5955 (CZG 574)	34	30-39	36	25	18-1304-DG-4517 (CZG 206)	52	50-63	45	35
18-1031-DG-4119 (CZG 90)	35	30-39	39	28	18-1453-DG-4874 (CZG 272)	52	50-63	53	45
18-1105-DG-4218 (CZG 119)	35	30-39	38	26	18-2716-DG-6324 (CZG 664)	52	50-63	48	41
18-1442-DG-4861 (CZG 267)	35	30-39	38	33	18-0956-DG-4037 (CZG 22)	53	50-63	52	33
18-2384-DG-5941 (CZG 563)	35	30-39	36	29	18-1022-DG-4110 (CZG 81)	53	50-63	48	43
18-0986-DG-4070 (CZG 51)	36	30-39	37	27	18-1121-DG-4235 (CZG 130)	53	50-63	50	42
18-0997-DG-4082 (CZG 61)	36	30-39	36	37	18-1159-DG-4282 (CZG 160)	53	50-63	54	42
18-1173-DG-4296 (CZG 171)	36	30-39	32	26	18-1802-DG-5241 (CZG 426)	53	50-63	52	43
18-1333-DG-4683 (CZG 226)	36	30-39	36	25	18-2178-DG-5689 (CZG 512)	53	50-63	55	44
18-1610-DG-5034 (CZG 326)	36	30-39	43	33	18-2408-DG-5971 (CZG 578)	53	50-63	49	39
18-1937-DG-5387 (CZG 455)	36	30-39	39	24	19-0138-DG-6593 (CZG 687)	53	50-63	48	40
18-2659-DG-6242 (CZG 654)	36	30-39	43	31	19-0162-DG-6618 (CZG 701)	53	50-63	50	43
18-0947-DG-4030 (CZG 13)	37	30-39	42	29	18-0980-DG-4064 (CZG 45)	54	50-63	51	46
18-0998-DG-4083 (CZG 62)	37	30-39	37	41	18-1000-DG-4085 (CZG 64)	54	50-63	50	42
18-1016-DG-4104 (CZG 77)	37	30-39	38	29	18-1069-DG-4177 (CZG 95)	54	50-63	46	48
18-1168-DG-4291 (CZG 167)	37	30-39	44	43	18-1343-DG-4693 (CZG 236)	54	50-63	52	40
18-1235-DG-4400 (CZG 188)	37	30-39	44	29	18-1460-DG-4882 (CZG 278)	54	50-63	53	41
18-1456-DG-4877 (CZG 275)	37	30-39	41	32	18-1493-DG-4915 (CZG 284)	54	50-63	50	41

vzorek	chrono. věk	věk. sk.	odhad věku kit2	odhad věku kit1	vzorek	chrono. věk	věk. sk.	odhad věku kit2	odhad věku kit1
18-1490-DG-4912 (CZG 281)	37	30-39	37	32	18-1520-DG-4937 (CZG 301)	54	50-63	50	43
18-1919-DG-5376 (CZG 448)	37	30-39	34	24	18-1524-DG-4941 (CZG 305)	54	50-63	44	38
18-2168-DG-5680 (CZG 502)	37	30-39	34	32	18-1932-DG-5382 (CZG 450)	54	50-63	50	37
18-2204-DG-5715 (CZG 521)	37	30-39	37	29	18-2660-DG-6243 (CZG 655)	54	50-63	44	38
18-2559-DG-6131 (CZG 614)	37	30-39	41	32	18-0946-DG-4029 (CZG 12)	55	50-63	54	44
18-1094-DG-4207 (CZG 111)	38	30-39	43	33	18-1024-DG-4112 (CZG 83)	55	50-63	50	46
18-1507-DG-4930 (CZG 294)	38	30-39	41	29	18-1180-DG-4303 (CZG 176)	55	50-63	48	38
18-2014-DG-5573 (CZG 478)	38	30-39	36	27	18-1417-DG-4822 (CZG 249)	55	50-63	51	44
18-2201-DG-5713 (CZG 518)	38	30-39	36	25	18-1741-DG-5176 (CZG 409)	55	50-63	60	36
19-0030-DG-6477 (CZG 674)	38	30-39	35	29	18-1100-DG-4213 (CZG 114)	56	50-63	50	43
18-0958-DG-4039 (CZG 24)	39	30-39	39	29	18-1702-DG-5134 (CZG 384)	56	50-63	54	41
18-1107-DG-4220 (CZG 121)	39	30-39	36	34	18-2610-DG-6182 (CZG 639)	56	50-63	46	36
18-1419-DG-4824 (CZG 251)	39	30-39	43	35	18-1177-DG-4300 (CZG 175)	57	50-63	59	53
18-1662-DG-5092 (CZG 357)	39	30-39	42	34	18-1425-DG-4830 (CZG 257)	57	50-63	52	44
18-1688-DG-5120 (CZG 370)	39	30-39	45	34	18-1505-DG-4928 (CZG 293)	57	50-63	57	51
18-1719-DG-5222 (CZG 396)	39	30-39	38	32	18-1801-DG-5240 (CZG 425)	57	50-63	51	30
18-1809-DG-5247 (CZG 433)	39	30-39	40	32	18-0923-DG-3995 (CZG 7)	58	50-63	54	50
18-1914-DG-5372 (CZG 443)	39	30-39	40	28	18-1013-DG-4101 (CZG 74)	58	50-63	49	42
18-2411-DG-5974 (CZG 581)	39	30-39	43	34	18-1021-DG-4109 (CZG 80)	58	50-63	47	43
18-2609-DG-6181 (CZG 638)	39	30-39	44	32	18-1182-DG-4305 (CZG 178)	58	50-63	64	41
19-0138-DG-6590 (CZG 684)	39	30-39	38	27	18-1700-DG-5132 (CZG 382)	58	50-63	57	52
18-0969-DG-4049 (CZG 35)	40	40-49	38	23	18-1027-DG-4115 (CZG 86)	59	50-63	59	55
18-1067-DG-4175 (CZG 93)	40	40-49	35	26	18-1088-DG-4201 (CZG 105)	59	50-63	60	52
18-1254-DG-4489 (CZG 196)	40	40-49	38	37	18-1608-DG-5032 (CZG 324)	59	50-63	50	41
18-1339-DG-4689 (CZG 232)	40	40-49	48	37	18-2423-DG-5989 (CZG 590)	59	50-63	56	43
18-1526-DG-4943 (CZG 307)	40	40-49	42	34	18-2603-DG-6175 (CZG 632)	59	50-63	63	44
18-1547-DG-4971 (CZG 315)	40	40-49	46	31	19-0135-DG-6609 (CZG 695)	59	50-63	58	44
18-1632-DG-5060 (CZG 341)	40	40-49	38	27	18-1329-DG-4679 (CZG 222)	60	50-63	55	48
18-2018-DG-5577 (CZG 482)	40	40-49	33	22	18-1938-DG-5388 (CZG 456)	60	50-63	59	39
19-0138-DG-6591 (CZG 685)	40	40-49	36	29	18-2379-DG-5947 (CZG 558)	63	50-63	60	43