

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Rozlišení podskupin lidských Alu repetitív při
epigenetické typizaci**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Lukáš Šulík**
Studijní program: B1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.**
Termín odevzdání práce: 2024

Bibliografická identifikace

Jméno autora:	Lukáš Šulík
Název práce:	Rozlišení podskupin lidských Alu repetice při epigenetické typizaci
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2024

Abstrakt: Epigenetika je vědní obor ve sféře molekulární biologie, který se zabývá dědičnými změnami v genové expresi bez změny v samotné sekvenci DNA. Mezi hlavní a výzkumně nejvýznamnější epigenetickou modifikací je metylace cytosinů prostřednictvím metyltransferáz. Z literatury je známo, že metylace cytosinů se mění s věkem. Metylace podléhají také Alu repetice, jakožto retrotranspozony, které se v genomu vyskytují ve velkém počtu. Tento marker by mohl být ve forenzních vědách užitečný k určení věku zůstavitele stopy z DNA nalezené na místě činu.

V rámci teoretické části této práce byla vypracována literární rešerše o epigenetice a její roli v regulaci genové exprese, metylaci cytosinu, o Alu repeticích, biomarkerech epigenetického určení věku a o metodách analýzy metylace DNA pomocí PCR a sekvenace.

V experimentální části byly navrženy a vyhledány primery pro Alu podrodiny po bisulfitové reakci, byla optimalizována PCR. Ačkoliv navržené primery nevykazovaly příznivou amplifikaci Alu podrodin, primery z literatury a odzkoušené primery Alu podrodin amplifikovaly. Amplikony byly podrobeny tagmentaci, byly vytvořeny knihovny, ze kterých byl vytvořen pool o koncentraci 4,3 ng/μl, který bude v budoucnu analyzován metodou MPS pro určení věku ve snaze snížit potřebné množství vstupní DNA.

Klíčová slova:	Alu repetice, PCR, metylace, epigenetika, predikce věku
Počet stran:	71
Počet příloh:	2
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's name: Lukáš Šulík
Title: Differentiation of human Alu repeats subgroups in epigenetic typing
Type of thesis: Bachelor
Department: Institute of Molecular and Translational Medicine
Supervisor: prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.
The year of presentation: 2024

Abstract: Epigenetics is a branch of molecular biology that deals with heritable changes in gene expression without changes in the DNA sequence itself. Among the primary and most significant epigenetic modifications under investigation is the methylation of cytosines mediated by methyltransferases. It is known from the literature that cytosine methylation changes with age. Alu repeats, as retrotransposons, are also subject to methylation and are abundant in the genome. This marker may be useful in forensic science to determine the age of perpetrator from DNA found at a crime scene.

In the theoretical part of this thesis, a literature search was done on epigenetics and its role in the regulation of gene expression, cytosine methylation, Alu repeats, biomarkers of epigenetic age determination, and on methods of DNA methylation analysis by PCR and sequencing.

In the experimental part, primers for Alu subfamilies were designed and searched in the literature and PCR was optimized after bisulfite reaction.

Although the designed primers did not show favorable amplification of the Alu subfamilies, primers from the literature and the previously tested primers amplified the Alu subfamilies. The amplicons were subjected to tagging, libraries were constructed from which a pool of 4.3 ng/μl was created, which will be analyzed by MPS in the future to determine age in an effort to reduce the amount of input DNA required.

Keywords: Alu repeats, PCR, methylation, epigenetics, age prediction
Number of pages: 71
Number of appendices: 2
Language: Czech

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením prof. Mgr. Jiřího Drábka, Ph.D. za použití citované literatury uvedené na konci této práce.

V Olomouci dne:

Podpis:

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval svému vedoucímu bakalářské práce, prof. Mgr. Jiřímu Drábkovi, Ph.D., za jeho vstřícný přístup, trpělivost a odborné vedení při zpracování této bakalářské práce. Dále děkuji Mgr. Lucii Kotkové za její rady a pomocnou ruku. Taktéž chci poděkovat mé rodině, která mi umožnila studium na vysoké škole a za jejich podporu napříč celým studiem. V neposlední řadě děkuji mým přátelům za nekonečnou oporu.

Tato bakalářská práce vznikla v rámci projektů LM2023033, LM2023053, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_026/0008448, EF16_013/0001674, LM2023067, LX22NPO5102, TN02000109, CZ.02.01.01/00/22_008/0004644 a IGA LF UP 2023_006.

Obsah

1. ÚVOD	9
2. CÍLE	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1. Epigenetika a její role v regulaci genové exprese	11
3.1.1. Modifikace histonů	11
3.1.2. Nukleární organizace	11
3.1.3. Editace RNA	12
3.1.4. Genomový imprinting	12
3.1.5. Metylace a demetylace cytosinů v DNA	13
3.2. Tkáňová specificita	15
3.3. Biomarkery epigenetického určení věku	16
3.3.1. Genomová nestabilita	17
3.3.2. Zkracování telomer	18
3.3.3. Buněčná senescence	19
3.3.4. Produkty pokročilé glykace a glykosylace	19
3.3.5. Mitochondriální delece	21
3.3.6. Proteomické markery	22
3.3.7. miRNA	22
3.3.8. Metylace DNA pro určení věku	23
3.4. Sekvence DNA dle zastoupení v genomu	23
3.4.1. Jedinečné sekvence	23
3.4.2. Tandemové repetice	24
3.4.3. Transpozony	24
3.5. Metody detekce metylace	26
3.5.1. PCR metody s využitím restričních endonukleáz	26
3.5.2. Metody s využitím afinity	27

3.5.3.	Metody s využitím bisulfitové konverze.....	27
3.5.4.	PCR metody bez nutnosti využití bisulfitové konverze.....	28
3.5.5.	Detekce metylace sekvenační metodou z jedné buňky.....	29
3.5.6.	Metody s využitím sekvenace nové generace.....	30
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
4.1.	Biologický materiál.....	32
4.2.	Použité chemikálie a reagenty.....	32
4.3.	Spotřební materiál.....	33
4.4.	Pomůcky.....	33
4.5.	Použité kity.....	33
4.6.	Laboratorní přístroje.....	33
4.7.	Software.....	34
4.8.	Metodika.....	34
4.8.1.	Izolace DNA.....	34
4.8.2.	Fluorometrická kvantifikace DNA pomocí Qubit dsDNA HS Assay kitu.....	34
4.8.3.	Bisulfitová konverze.....	35
4.8.4.	Návrh primerů.....	36
4.8.5.	Testování primerů navržených v software BiSearch a PrimerSuite.....	37
4.8.6.	Testování primerů nalezených v literatuře a dalších navržených primerů.....	40
4.8.7.	Optimalizace primerů.....	41
4.8.8.	Testování optimalizovaných primerů na bisulfitované DNA mladých a starých jedinců.....	43
4.8.9.	Fluorometrická kvantifikace a tvorba poolů.....	45
4.8.10.	Přečištění poolů.....	46
4.8.11.	Příprava knihoven.....	47
5.	Výsledky.....	50
5.1.	Vyhodnocení testování primerů navržených v software BiSearch a PrimerSuite.....	50

5.2.	Vyhodnocení testování primerů nalezených v literatuře a dalších navržených primerů	50
5.3.	Vyhodnocení kvantifikace izolované DNA pomocí Qubit dsDNA HS Assay kitu	50
5.4.	Vyhodnocení optimalizace primerů	51
5.5.	Vyhodnocení testování optimalizovaných primerů na bisulfitované DNA mladých a starých jedinců	53
5.6.	Vyhodnocení kvantifikace DNA a založení knihoven.....	53
6.	DISKUSE.....	56
7.	ZÁVĚR	59
8.	LITERATURA.....	60
	SEZNAM ZKRATEK.....	64
9.	SEZNAM OBRÁZKŮ	67
10.	SEZNAM TABULEK.....	68
11.	Přílohy	70

1. ÚVOD

Regulace genové exprese je nástroj, který udává, jaký gen se má exprimovat a jaký ne. Touto problematikou se zabývá epigenetika zkoumající širokou škálu modifikací DNA bez změn na její primární struktuře (Al Aboud *et al.*, 2018). Tyto změny se podílejí jak na vývoji organismu, tak na patologických procesech jako je rakovina nebo diabetes (Fazzari, Greally, 2010). Významnými epigenetickými modifikacemi jsou například metylace DNA, modifikace histonů nebo editace RNA.

Tato práce klade důraz na metylaci cytosinu. Tento proces spočívá v kovalentnímu připojení metylové skupiny na cytosin pomocí DNA metyltransferáz za vzniku 5-metylcytosinu. Methylace cytosinu se soustřeďuje na CpG místa (cytosin-fosfát-guanin). Tento reverzibilní proces hraje důležitou roli v regulaci genové exprese a diferenciaci buněk a tkání (Lanata *et al.*, 2018).

Alu repetice jsou krátké úseky DNA, které se vyskytují napříč celým genomem v mnoha kopiích. Jsou klasifikované jako SINE retrotransposony, které se dělí do mnoha podrodin. Alu repetice se významně podílejí na regulaci genové exprese, protože jsou bohaté na CpG místa, které podléhají metylaci (Deininger, 2011). Methylace se čím dál více využívá jako biomarker stárnutí, protože některé CpG ostrůvky mění svůj metylační profil v závislosti na věku. Analýzou těchto ostrůvků můžeme s vysokou přesností určit chronologický a biologický věk (Borský, Holmannová, Borská *et al.*, 2023). Analýza metylačního profilu může být kromě diagnostiky využita v kriminalistice k odhadu věku ze vzorků DNA nalezených na místě činu, například z krve nebo spermatu (Kotková, Drábek, 2023).

Teoretická část této bakalářské práce se zabývá epigenetikou a její rolí v regulaci genové exprese, dále metylací DNA, biomarkery stárnutí a možnostmi analýzy metylace metodami PCR a sekvenace. Experimentální část se zaměřuje na bisulfitační reakci, návrh primerů pro podrodiny Alu repetice po bisulfitační reakci a vyhledání primerů v literatuře, optimalizaci těchto primerů a odzkoušení primerů na metylované DNA po bisulfitové reakci dárce a přípravu ampliconů pro masivně paralelní sekvenaci. Cíl experimentu spočívá v potenciálním využití podrodin Alu repetice pro snížení množství vstupní DNA pro určení věku.

2. CÍLE

- Sepsat literární rešerši o epigenetice, její roli v regulaci genové exprese a o metodách epigenetického určení věku.
- Vyhledat, navrhnout a otestovat PCR primery pro masivně paralelní sekvenování pro podrodiny lidských Alu repetit po bisulfitační reakci.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Epigenetika a její role v regulaci genové exprese

Epigenetika je vědní disciplína, která se zabývá dědičnými změnami v genové expresi, kdy dochází k jiným změnám než změnám v samotné sekvenci DNA. Mechanismy epigenetiky neovlivňují sekvenci DNA jako takovou – regulují genovou expresi její chemickou modifikací (Al Aboud *et al.*, 2018). Metylace cytosinů na CpG dinukleotidech je nejlépe prozkoumaným epigenetickým jevem a jejím speciálním případem je genomový imprinting. Mezi další epigenetické změny patří modifikace histonů, nukleární reorganizace a editace RNA.

Výše uvedené mechanismy mohou být spojeny s různými patologickými projevy, například s rakovinou nebo diabetem. Nejvýznamnější strůjce těchto projevů jsou metylační změny, a to jak globální, tak specifické pro jednotlivé geny (Fazzari, Greally, 2010).

3.1.1. Modifikace histonů

Histony jsou bazické nukleoproteiny obsahující značné množství argininu a lysinu, jež hrají důležitou roli ve stavbě nukleozomu, tvořícího základy chromatinu chromozomů.

Posttranslační modifikace histonů, probíhající zejména na jejich N-konci, zahrnují acetylaci, metylaci, fosforylaci, ubikvitinaci a sumoylaci. Největší roli v regulaci genové exprese hraje acetylace a deacetylace lysinových zbytků. Tyto procesy indukují konformační změny nukleozomů, a tím mění celkovou chromatinovou strukturu. Acetylace i deacetylace jsou udržovány v rovnováze enzymaticky, histonovou acetyltransferázou (HAT) a histonovou deacetylázou (HDAC).

Řada transkripčních faktorů je spojena s proteiny, které mají histon-acetyltransferázovou aktivitu. Tyto proteiny, známé jako koaktivátory, hrají klíčovou roli v aktivaci transkripce. Naopak histonové deacetylázy fungují jako korepresory genové exprese způsobující kondenzaci chromatinu (Slabý *et al.*, 2015).

3.1.2. Nukleární organizace

Rozvržení jádra na kompartmenty není náhodné a představuje trojrozměrnou strukturu a polarizaci chromozomů. Jednotlivé chromatinové domény savců jsou uspořádány

radiálně. Přesunutí genů poblíž nebo do heterochromatinových domén má za následek jejich umlčení, které může být permanentní. Naopak, geny přesunuté do blízkosti nebo přímo do domén transkripčně aktivního euchromatinu jsou transkribovány s vyšší četností. Jedním z příkladů ovlivnění exprese na základě organizace jaderné struktury je rakovina, jejíž různé typy dramaticky mění architekturu jádra a chromatinu ve svůj prospěch (Espada, Esteller, 2007).

3.1.3. Editace RNA

RNA je mimo jiné odpovědná i za přenos informace o enviromentálních podmínkách přímo do systému přenosu genetické informace, a to pomocí změn na sobě samotné. Tyto změny ovlivňují regulační dráhy řízené RNA. Jsou známy dvě enzymatické změny. První změnou je katalýza deaminace adenosinu na inosin (A-to-I) ADAR enzymy. Druhou enzymatickou změnou (hlavně u savců) je katalýza deaminace cytidinu na uracil. Tímto způsobem je pozměňována sekvence aminokyselin savců a primátů (Mattick et al., 2009).

Většina editací je lokalizována v nekódujících sekvencích, což naznačuje jejich regulační funkci ovlivňující vývoj a funkci mozku a ve formování paměti, a to kvůli ovlivňování sekvencí aminokyselin receptorů neurotransmiterů, majících vliv na elektrofyziologické pochody synapsí (Mattick et al., 2009). Editace RNA u lidí probíhá převážně na Alu sekvencích, jež jsou specifické pro primáty, kde podporují kognitivní vývoj (Mattick et al., 2009). Úprava Alu sekvencí slouží k potlačení jejich retrotranspozice. Pokud jsou Alu v regulační oblasti genu, může úprava Alu sekvence ovlivnit jeho expresi (Hancks, Kazanian, 2016). Alu RNA může fungovat jako transkripční represor vážící se na RNA polymerázu II, může tedy regulovat alternativní sestřih, stabilitu a translaci mRNA.

3.1.4. Genomový imprinting

Organismy s diploidním genomem obsahují dvě sady homologních chromozomů v jádře. Tyto chromozomy nesou autozomální geny, přičemž každý z těchto genů má dvě alely, z nichž každá pochází od jednoho z rodičů.

Genomovým imprintingem se rozumí zvrátitelný proces, při kterém dochází k epigenetickým změnám, především metylací genů, v jedné z parentálních generací. Tato epigenetická modifikace způsobuje rozdíly v expresi genů mezi paternálním

a maternálním genomem v diploidních buňkách potomků. To znamená, že exprese určitého genu závisí na tom, zda je gen zděděn od otce nebo od matky (Slabý *et al.*, 2015). Příkladem klinického projevu genomového imprintingu je Beckwith-Wiedmannův syndrom (prenatální nadměrný růst dítěte), způsobený geny *IGF2*, *LIT1*, jejichž exprimovaná alela pocházela pouze od otce (Seemanová, 2003).

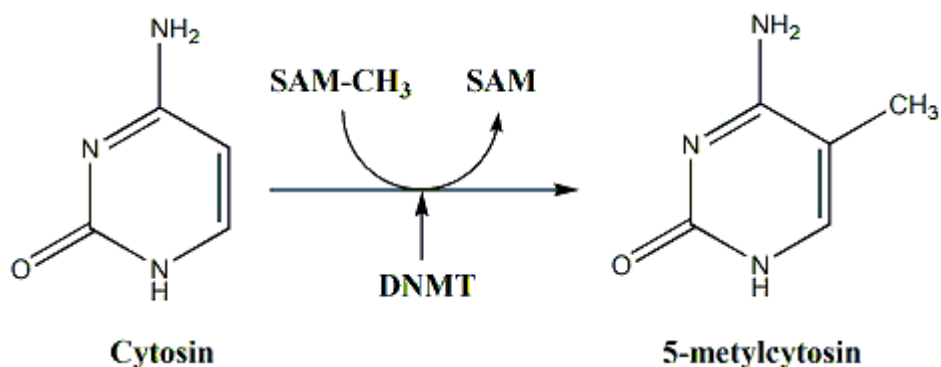
3.1.5. Metylace a demethylace cytosinů v DNA

Methylace zastává důležitou roli v regulaci genové exprese a biologických procesů, stejně tak jako v diferenciaci buněk a tkání. Methylace DNA je řízena metylačními enzymy, které kovalentně připojují metylovou skupinu na cytosinové báze. Naopak, demetylační enzymy jsou odpovědné za zpětnou demetylaci této báze.

Methylace DNA je rozvržena nerovnoměrně a asymetricky napříč genomem. Kromě toho, že metylační profil je specifický pro jednotlivé tkáně a buňky, je asociován i s mnohými nádorovými onemocněními.

Methylace je proces, při kterém se díky metyltransferázám (DNMTs), jež využívají S-adenosylmethionin jako kofaktor, kovalentně připojuje metylová skupina na C-5 pozici cytosinu v řetězci DNA (Robertson, 2005). V 98 % případů probíhá methylace cytosinů na CpG (cytosin-fosfát-guanin) úsecích DNA (Jin, Li, Robertson, 2011). Ty CpG úseky, které jsou asociovány s promotory somatických buněk, jsou většinou na kódujících místech nemetylovány (Kim *et al.*, 2009). Methylace v CpG místech v promotoru jsou asociovány s represí genu; naopak hypomethylace v oblasti promotoru a hypermethylace v oblasti genu jeho expresi podporují (Lanata *et al.*, 2018).

Na **Obrázku 1** je popsána konverze metylace cytosinové báze.



Obrázek 1: Konverze cytosinu na 5-methylcytosin DNA metyltransferázou (DNMT), která katalyzuje přenos metyl skupiny (CH₃) z S-adenosylmethioninu (SAM) na pozici 5. uhlíku (Převzato a upraveno z Gibney *et Nolan*, 2010)

Genom savců obsahuje přibližně 3×10^7 zbytků 5-methylcytosinu (m5C), převážně obsažených v dinukleotidech 5'-m⁵CG-3'. Reverzibilní procesy metylace a demethylace hrají roli při regulaci normálního vývoje savců, i když dosud nebylo prokázáno, že by tento mechanismus přímo ovlivňoval konkrétní gen s tkáňově specifickým účinkem. Methylace cytosinu hraje klíčovou roli v ireverzibilní inaktivaci promotorů mnoha imprintovaných genů, genů podléhajících inaktivaci X, stejně jako promotorů transpozonů a také endogenních retrovirů. Exprese imprintovaných genů je pevně stanovena v zárodečné linii předchozí generace, zatímco exprese genů vázaných na chromozom X je určena ve stádiu raného embrya (Bestor, 2000).

Demethylace cytosinů může probíhat buď pasivně nebo aktivně.

Pasivní demethylace je znak oxidativního stresu a probíhá hlavně v průběhu dělení buňky. Jedná se o snížení aktivity nebo množství DNMTs. Mohou ji ovlivňovat transkripční faktory a mikro-RNA. V případě nízké koncentrace DNMT1 nejsou metylační vzorce plně převzaty během mitózy z mateřských buněk do dceřiných s následkem pasivní demethylace. Regulace enzymu DNMT1 je uskutečňována přes signální dráhu mitogenem aktivované proteinkinázy/ERK (MAPK/ERK), jejíž poškození vede k chybné regulaci DNMT1 při mitotickém dělení, což vede ke globální demethylaci DNA v T-lymfocytech a rozvoji autoimunitního onemocnění SLE (systémový lupus erythematoses).

Aktivní demethylace je řízena 5-TET (Ten Eleven Translocation) proteiny, které aktivně odstraňují metylační značení cytosinů. Tyto cytosiny jsou poté podrobeny opravě a vloženy zpět do genomu (Lanata, Chung, Criswell, 2018). DNMT1 dále není

schopno re-metylovat nově nasyntetizovaný řetězec DNA, protože informace o metylaci se dělením buněk vytrácí. Kvůli tomu mohou TET proteiny oxidovat 5-hydroxymetylcytosin (konverze 5mC na 5hmC katalyzovaná TET dioxygenázou) na 5-formylcytosin, který je dále oxidován na 5-karboxycytosin (Wang, Loo, Kohli, 2022). Tymidin DNA glykosyláza poté tyto cytosiny odstraňuje, což indukuje opravu bází a následné představení nového nemetylovaného cytosinu. (Scourizic, Mouly, Bernard, 2015).

3.2. Tkáňová specificita

Stárnutí je sled biochemických dějů, které mají za důsledek poškození organismu na molekulární, buněčné a orgánové úrovni. Tato poškození vedou ke ztrátě fyziologických funkcí až po smrt (Krištić *et al.*, 2014).

Buňky různých tkání jsou od sebe odlišné jak anatomicky, tak fyziologicky. Tento fakt má základ v odlišnosti buněčných fenotypů, které jsou z velké části odrazem epigenetických změn hrajících roli v buněčné diferenciaci. Nejvýznamnějším markerem je metylace DNA (cytosinů), která udává, jaký gen se má exprimovat a jaký ne. Metylace je úzce spojována s CpG ostrůvky v oblasti promotorů (Christensen *et al.*, 2009). Zdravé tkáně se od sebe odlišují metylačním profilem v oblasti promotorů, například vzorky odebrané z gastrointestinální soustavy (žaludek, jícen, střevo) vykazují podobný metylační vzorec, který je odlišný od metylačního vzorce jiných tkáňových struktur (např. nervové soustavy) (Miller *et al.*, 2023).

Donedávna bylo předpokládáno, že CpG ostrůvky jsou nemetylované, kromě těch na inaktivovaném X chromozomu a v imprintovaných regionech. V posledních letech se dostal do popředí výzkum tzv. tkáňově specifických metylovaných regionů (TDMR) pomocí metod „DNA methylation arrays“. TDMRs jsou oblasti v genomu, které vykazují rozdíly v metylaci DNA mezi různými tkáněmi organismu. Bylo prokázáno, že hrají důležitou roli v regulaci genové exprese a v procesu vývoje. TDMR regiony jsou metylovány v raných stádiích vývoje a demetylovány v pozdějším stádiu; např. TMDR specifické pro varlata jsou plně metylované při narození a demetylace nastává až postnatálně (Song *et al.*, 2009).

3.3. Biomarkery epigenetického určení věku

Ve forenzní sféře může být určení věku klíčovým prvkem vyšetřování. Metylační profil určující věk ze vzorků spermatu (sexuální zločiny), tak z krve (násilné trestné činy) slouží jako pomocný marker pro zúžení populace při hledání pachatele. Kromě tohoto využití je metylační profil důležitý v klinické praxi při diagnostice chorob (Kotková, Drábek, 2023).

Dříve se věk určoval pomocí mitochondriální DNA (mt-DNA). Uvolňování mitochondrií-vytvořených reaktivních kyslíkových radikálů v procesu rozpadu enzymů při oxidativní fosforylaci indukuje v samotné mitochondrii změny (narušení fosfolipidů a proteinů), jež vedou k mutacím, které jsou spojené se stárnutím. Přitom se jednotlivé mutace mt-DNA mezi jednotlivými tkáněmi jednoho člověka liší. To stejné platí i v rozdílu mezi jedinci – profil mt-DNA mutací je u každého člověka unikátní, proto ani tato metoda není příliš specifická a neurčí přesný věk, spíše širší rozmezí (Zapico, Ubelaker, 2016).

Dnešní biomarkery pro určení věku můžeme rozdělit do několika skupin. Základní je rozdělení na jednoduché a složené. Jednoduché můžeme vyčlenit na molekulární (epigenetické změny, zkracování telomer, buněčná senescence), fyziologické a anatomické. Složené biomarkery zahrnují epigenetické hodiny a -omics metody (Borský, Holmannová, Borská *et al.*, 2023).

Hodiny (epigenetické hodiny) jsou marker založený na analýze metylace na CpG ostrůvcích (cytosin-fosfát-guanin) za vzniku 5-metylcytosinu, který ovlivňuje expresi genů v blízkosti těchto ostrůvků. Bylo vyvinuto mnoho algoritmů, které z CpG ostrůvků dokážou určit kalendářní věk s velkou přesností. Příklad tohoto algoritmu jsou Horvathovy hodiny, které dokáží přesně určit metylaci na základě 353 CpG míst, a tak i biologický věk, jehož nárůst je při rakovinném bujení zrychlen. Překvapivě je zrychlení pomalejší při různých somatických mutacích, například při mutacích genů, regulujících telomerázy nebo při mutaci *TP53* genu, který kóduje p53 protein (Horvath, 2013). Při různých patologiích se metylace mění a je tedy určen vyšší věk než kalendářní, ten je označován jako biologický. Díky určenému biologickému věku můžeme v klinické praxi odhadovat pravděpodobnost výskytu různých onemocnění jako rakovina nebo Alzheimerova choroba (Borský, Holmannová, Borská *et al.*, 2023).

Omiky jsou markery, které sledují biomolekuly stejného typu a jsou postaveny na velkém množství dat. Genomika sleduje genom, dědičnost a v našem případě hodnotí biologický věk na základě analýzy specifických genů. Transkriptomika se

zabývá RNA jako celkem (tRNA, mRNA, rRNA a nekódující RNA), a to na úrovni transkripce, exprese a umístění v buňce. Proteomika identifikuje a zkoumá obsah všech proteinů na buněčné nebo tkáňové úrovni pomocí metod jako hmotnostní spektrometrie nebo Western blot. Metabolomika se zabývá kvantifikací a identifikací metabolitů ve vzorku. Všechny omiky se využívají jakožto hodiny k určení biologického věku (Borský, Holmannová, Borská *et al.*, 2023).

Jednoduché biomarkery měří pouze jeden specifický a důležitý parametr nebo omezenou skupinu vzájemně souvisejících parametrů, které jsou známy pro svou spojitost s věkem. Tyto změny reflektují proces stárnutí u lidí nebo laboratorních modelů. Mezi tyto markery patří genomová nestabilita, zkracování telomer, buněčná senescence, produkty pokročilé glykace a glykosylace, mitochondriální delece, proteomické markery, miRNA a metylace DNA. Tyto markery jsou definovány v následujících kapitolách.

3.3.1. Genomová nestabilita

Genomová nestabilita je stav, kdy je normální struktura nebo sekvence genomu narušena nebo změněna. Bývá vyvolaná poškozením DNA různými fyzikálními, chemickými a biologickými faktory, představuje riziko časného úmrtí a maligní transformace buněk. Genomová nestabilita se projevuje na úrovni mikrosatelitů a na úrovni chromozomů.

Mikrosatelitní nestabilita je charakterizovaná změnami v počtu opakovaných tandemových repetitiv v důsledku nedostatečné opravy DNA během replikace. Chromozomální nestabilita zahrnuje chromozomální zlomy, translokace, delece, duplikace nebo získání nových částí chromozomů a je spojena s poruchami v mechanismech opravy DNA, dělení buněk nebo expozicí genotoxickým látkám.

Pro kvantifikaci dvojitých zlomů DNA, indikujících nestabilní DNA, se využívá imunofluorescenční měření fosforylovaného histonu *H2AX*. Oxidace DNA vytváří produkt 8-oxo-2'-deoxyguanosin, jehož hladiny stoupají s věkem, což poskytuje nepřímý ukazatel poškození DNA.

Genetické vyšetření může odhalit genetické syndromy ovlivňující rychlost stárnutí, ale není schopno přesně určit rychlost stárnutí konkrétního jedince. Retrotranspozony, známé jako "skákaající geny", jsou schopny kopírovat svoji sekvenci z jednoho místa genomu na jiné místo. Přispívají ke genomové nestabilitě indukci různých mutací, a s věkem jejich aktivita vzrůstá. Ztráta represe a změny

v heterochromatinu mohou rovněž přispívat ke genomové nestabilitě. LINE-1 (L1), nejznámější skupina retrotranspozonů, je aktivní během embryogeneze a její míra transkripce stoupá spolu s věkem. Zvýšená exprese této skupiny retrotranspozonů je častěji detekována u chorob jako revmatoidní artritida nebo karcinom. Kromě toho se transkripce zvyšuje i při stresu a při vystavení člověka toxickým látkám (Borský, Holmannová, Borská *et al.*, 2023).

3.3.2. Zkracování telomer

Zkracování telomer je proces, při kterém při každém mitotickém dělení telomery postupně ubývá 50 – 200 párů bází. Když se zkrátí na kritickou délku, buňka ztrácí schopnost dalšího dělení a buď se stává senescentní nebo podstupuje apoptózu, což znamená programovanou buněčnou smrt. Délka telomer ovlivňuje nejen buněčné dělení, ale také celkovou strukturu a prostorové rozložení dvoušroubovice DNA (telomerní DNA tvoří *T-loops*, které svým ohybem pronikají do šroubovice DNA) (Lu *et al.*, 2013). Dlouhé telomery přispívají ke stabilizaci struktury, zatímco krátké telomery mají opačný efekt.

V minulosti byla měřena průměrná délka telomer, ale nyní se ukazuje důležitější měřit nejkratší telomery. Buňky s nejkratšími telomery jsou totiž imunologicky neaktivnější a výrazně přispívají k prozánětlivým procesům, jako je "*inflammaging*." Krátké telomery jsou také spojeny s vyšším rizikem celkové mortality.

Existuje několik metod měření nejkratších telomer, jako je qPCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce), TRF (terminální restriční fragment) a TeSLA (*Telomer Shortest Length Assay*). Délka telomer je spojena s aktivitou enzymu telomerázy, který zodpovídá za *de novo* prodlužování telomer většiny tkání dospělých. I když některé buňky, jako kmenové buňky, mají vysokou aktivitu telomerázy po celý život, u již diferencovaných buněk vyššího věku tato aktivita není dostatečná k zabránění postupnému zkracování telomer. Studie naznačují, že aktivita telomerázy klesá s věkem, zejména u osob starších 40 let (Borský, Holmannová, Borská *et al.*, 2023).

3.3.3. Buněčná senescence

Buněčná senescence se vyznačuje zastavením dělení buňky, zvýšenou odolností buňky vůči apoptóze a změnami v metabolismu, produkci a morfologii. Množství senescentních buněk se během stárnutí zvyšuje. Senescentní buňky vytvářejí látky, které dále vyvolávají senescenci v okolních buňkách. Přejít do senescence je obvykle spuštěn podněty, jako jsou oxidační stres, poškození DNA bez možnosti reparace nebo zkracování telomer.

Přechodu buňky do senescence předchází aktivace odpovědi na poškození DNA (*DNA damage response* - DDR), přičemž klíčovou roli hraje transkripční faktor p53. Buňka buď opraví DNA a pokračuje v buněčném cyklu, přejde do stavu senescence nebo do apoptózy.

Expres markerů (p16 a p53) nejenže stoupá s věkem, ale také se liší v jednotlivých tkáních. Klinické studie prokázaly vyšší expresi p16 a p21 v mnoha typech tkání u osob starších 66 let ve srovnání s mladšími jedinci. Největší rozdíly byly zaznamenány v epidermis a ledvinách. Nárůst exprese p16 byl zdokumentován také v lidských T-lymfocytech a slinných žlázách dolního rtu, kde byla zaznamenána korelace s poklesem kognitivních funkcí (Borský, Holmannová, Borská *et al.*, 2023).

Aktivace DDR, pokud je trvalá, vede k produkci *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (SASP), kde se zvýšeně uvolňují prozánětlivé cytokiny, růstové faktory, proteázy, extracelulární vezikuly, solubilní receptory a ligandy. Lysozomální β -galaktosidáza je považována za klíčový a snadno detekovatelný marker senescence, jejíž aktivita s věkem klesá, což vede ke kumulaci substrátů v lysozomech. Přítomnost lipofuscinu může též signalizovat senescenci, s výhodou detekce nejen v živých buňkách a tekutinách, ale i v zamrazených tkáních (Borský, Holmannová, Borská *et al.*, 2023).

3.3.4. Produkty pokročilé glykace a glykosylace

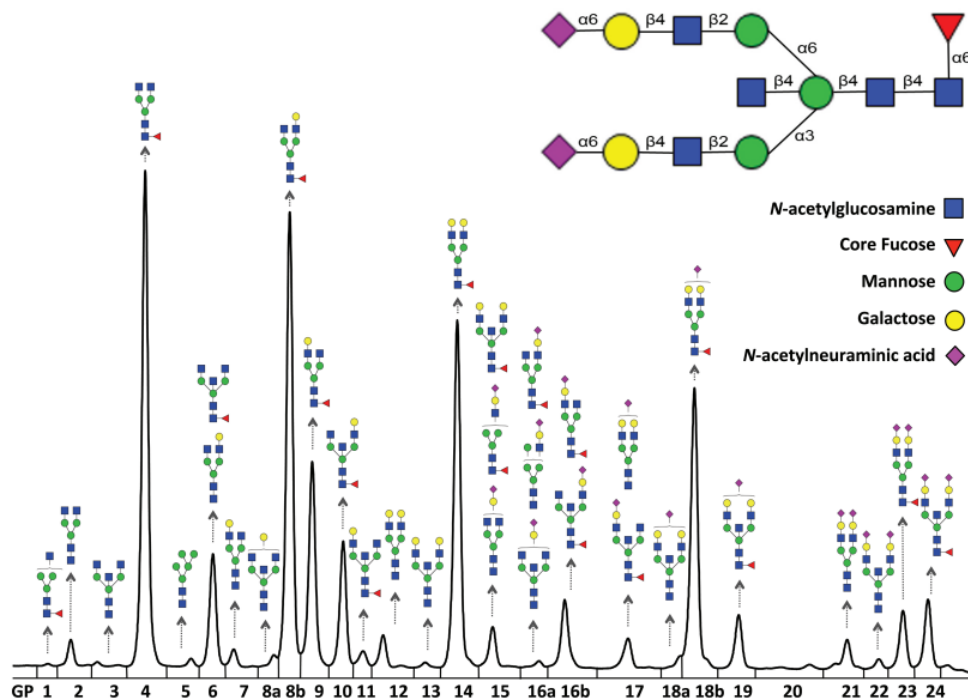
Glykace je děj charakterizován vazbou sacharidů na proteiny, lipidy, nukleosidy bez účasti enzymů. Modifikují se DNA, hemoglobin nebo protilátky a tyto změněné produkty se označují jako produkty pokročilé glykace (AGE, Advanced Glycation End-products). Koncentrace AGE s přibývajícím chronologickým věkem roste kumulací, a to jak intracelulárně (důsledkem je poškození mitochondrií), tak extracelulárně (připojením na elastin nebo kolagen). AGE jsou odbourávány glyoxalázovým systémem (skládající se z glyoxalázy 1, 2 a kofaktoru glutathionu).

Aktivita procesu odbourávání AGE věkem klesá, tím pádem je koncentrace AGE dobrým ukazatelem stárnutí, ale taky oxidačního stresu (Borský, Holmannová, Borská *et al.*, 2023).

Glykosylace je řízena glyktransferázami, jež jsou katalyzátory kovalentní vazby monosacharidu a proteinu či lipidu. V kontextu glykosylace je často zmiňována glykosylace IgG protilátek, jejímiž změnami lze odvodit chronologický a biologický věk. Na základě tohoto faktu byl vytvořen GlycanAge index, který vychází z toho, že v mládí je koncentrace digalaktosylovaných IgG s protizánětlivým charakterem vyšší a koncentrace prozánětlivých agalaktosylovaných IgG protilátek je nižší. Tento poměr se s rostoucím věkem obrací (Borský, Holmannová, Borská *et al.*, 2023).

Na **Obrázku 2** je znázorněna UPLC (ultra-výkonná kapalinová chromatografie) analýza glykosylovaného IgG imunoglobulinu. UPLC analýza je schopna rozeznat stavbu N-glykanu navázaného na těžkém řetězci IgG (na místě zbytku Asn) a rozdělit tyto komplexy IgG s příslušným N-glykanem do 24 vrcholů křivky, peaků (GP1-GP24). Ukázalo se, že 21 glykanů z 24 analyzovaných má asociaci s biologickým věkem, při čemž největší asociaci vykazují galaktózové glykany, kdy množství jejich digalaktózové formy (A2G2, FA2G1, A2BG2 a FA2BG2) je s věkem snižován (Krištić *et al.*, 2014).

Na této analýze byl zhotoven model predikující věk a již výše zmíněný GlycanAge index, který dokáže předpovědět věk pomocí tří glykanových proměnných (GP6, GP14 a GP15) s odchylkou 9,7 let (Krištić *et al.*, 2014).



Obrázek 2: UPLC analýza imunoglobulinu IgG a jeho glykosylace. (Převzato z Křištic *et al.*, 2014)

3.3.5. Mitochondriální delece

Mitochondrie jsou semiautonómny orgány eukaryotických buněk, které jsou děděny maternálně. Vyznačují se svojí citlivostí na stárnutí buňky (způsobenou například zvýšeným oxidačním stresem). Se stárnutím buňky mitochondrie nabývají cirkulárního stavu a zmenšují svůj objem; nastávají stále častější poruchy jejich dělení a začínají se kumulovat důsledkem zpomalení procesu mitofagie.

Stárnutí buňky doprovází zvýšená četnost mutací mitochondriální DNA (mt-DNA), přičemž je časem v buňce větší podíl zmutované mt-DNA, než té nezmutované. Příčinou tohoto jevu je pokles aktivity mitochondriální DNA polymerázy. Kromě morfologických změn mitochondrie ztrácí svoji schopnost v dostatečné míře provozovat respirační řetězec, to má za následek menší produkci ATP jakožto zdroje energie a vyšší produkci kyslíkových radikálů. Snižuje se také hladina nikotinamidadenindinukleotidu v jeho redukované (NADH) a oxidované (NAD⁺) formě, který slouží jako redoxní koenzym esenciální pro chod Krebsova cyklu, glykolýzy a při oxidaci mastných kyselin, expresi genů a oprav DNA. *GDF15* (*Grow Differentiation Factor 15*) se vyznačuje nízkou expresí, která se však zvyšuje

při buněčném stresu, spojeném se stárnutím. Následkem zvýšené exprese *GDF15* se snižuje mitochondriální aktivita a narůstá mortalita. Zvýšená hodnota *GDF15* je spojována s onemocněním kardiovaskulární soustavy a nádorovými onemocněními (Borský, Holmannová, Borská *et al.*, 2023).

3.3.6. Proteomické markery

V roce 2015 Menni *et al.* zveřejnila výzkum, jehož cílem bylo určit proteomické faktory stárnutí v krevní plazmě a mozkomíšním moku. K tomuto experimentu byl využit SOMAScan assay k analýze vzorků krve od 202 žen, následně od dalších 677 jedinců. Výsledky ukázaly, že jedenáct proteinů má spojitost s chronologickým věkem. Tyto proteiny byly dále analyzovány na úrovni genové exprese a byly vyčleněny dva proteiny, které mají největší asociaci s věkem, jsou to chordin-like protein 1 (*CHRD1* gen) a pleiotropin (*PTN* gen) (Menni *et al.*, 2015).

CHRD1 je antagonist morfogenních proteinů kostí a je klíčový regulátor embryonálního vývoje. Bylo zjištěno, že je 90 % množství *CHRD1* v plazmě je dáno prostředím, nikoliv dědičně. *CHRD1* značně ovlivňuje váhu při narození. Při nízké porodní váze je zde větší riziko infarktů, diabetu 2. typu a osteoporózy v pokročilém věku. Čím je větší porodní váha, tím je více *CHRD1*, a tím je tedy menší riziko výše zmíněných onemocnění. Tento marker může být sledován při určování věku, protože jeho množství v krvi se stoupajícím věkem stoupá (Menni *et al.*, 2015).

3.3.7. miRNA

MikroRNA (miRNA) jsou molekuly RNA o délce přibližně 22 nukleotidů, které nekódují proteiny, ale mají klíčovou roli v regulaci genové exprese.

Tyto molekuly nejsou důležité pouze během vývoje jedince, ale také v patologických procesech a v průběhu stárnutí. Výzkum zaměřený na analýzu miRNA z plné krve ukázal, že některé miRNA vykazují změny v expresi s postupujícím věkem (Borský, Holmannová, Borská *et al.*, 2023). V rámci výzkumu ve forenzní sféře vzniklo mnoho studií, které se pokoušely určit chronologický věk pachatele pomocí miRNA. V roce 2020 Fang *et al.* (Fang *et al.*, 2020) zveřejnil model určení věku ze stop krve pomocí machine learning AdaBoost algoritmu. Identifikoval šest miRNA, které souvisejí s věkem, a to miR-98-3p, miR-324-3p, miR-32-3p, miR-

330-5p, miR-374c-5p a miR-342-3p. Fangův model vykazoval chybovost v určení věku v rozmezí 5,52 až 7,46 let jak u mužů, tak u žen.

3.3.8. Metylace DNA pro určení věku

V kontextu biomarkerů stárnutí a metylace je v dnešní době hojně využívaná metoda epigenetických hodin, při které se využívá měření metylace na CpG ostrůvcích.

Má se za to, že díky této metodě se dá u zdravých osob s vysokou přesností určit chronologický věk. U nemocných osob nebo u osob s nezdravým životním stylem je určen vyšší věk než jejich chronologický; metoda určuje tedy jejich biologický věk. Čím je určen vyšší epigenetický věk, tím je větší pravděpodobnost vzniku závažných onemocnění, jako jsou nádorová onemocnění nebo Alzheimerova choroba (Borský, Holmannová, Borská *et al.*, 2023). Urychlení epigenetického stárnutí (Epigenetic Age Acceleration – EAA) nám ukazuje rozdíl mezi chronologickým věkem a věkem určením pomocí metylací. EAA v kladných hodnotách poukazuje na vyšší biologický věk a v záporných hodnotách značí, že organismus stárne pomaleji (Noroozi *et al.*, 2021).

Stárnutí organismu je komplexní biologický proces, který doprovází mnoho procesů a faktorů. Řadí se zde faktory genetické, epigenetické a enviromentální. Stárnutí doprovází také progresivní insuficience fyziologických funkcí, což s sebou nese také větší riziko propuknutí různých chorob, například rakoviny, Alzheimerovy choroby nebo různých kardiovaskulárních onemocnění.

Stárnutí na buněčné úrovni se vyznačuje molekulárními změnami. Epigenetické změny zahrnují změny genové exprese bez změny samotné sekvence (viz kapitola 3.1.). Je známo, že metylace DNA úzce koreluje se stárnutím, chronologickým a biologickým věkem. Předmětem mnoha metod určení věku je profilování metylace na CpG ostrůvcích (Maldonado *et al.*, 2023).

3.4. Sekvence DNA dle zastoupení v genomu

3.4.1. Jedinečné sekvence

Nerepetitivní sekvence jsou jedinečné single-copy DNA sekvence, které zahrnují kódující sekvence, nekódující RNA sekvence a sekvence regulující genovou expresi. Tyto sekvence tvoří asi 40–50 % celé lidské DNA (Liao *et al.*, 2023), přičemž jenom 4 % lidských genů kódují aminokyseliny. Nerepetitivní sekvence se

pro forezní určení věku člověka využívají nejčastěji (Bekaert *et al.*, 2015; Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015; Kotková, Drábek, 2023; Heidegger *et al.*, 2022).

Repetitivní DNA sekvence jsou sekvence, jejichž vzor se opakuje napříč celým genomem a tvoří ho z přibližně 50 %. DNA repetice mohou být rozděleny podle počtu opakování. Mezi repetice s vysokým opakováním spadá satelitní DNA (satDNA) (Liao *et al.*, 2023). Satelitní DNA může být nalezena na specifických místech na chromozomu, nejvíce v centromerách a telomerách (Liao *et al.*, 2023). Kromě repetice s vysokým opakováním jsou v genomu i méně opakuující se sekvence o velikosti 500 – 300 000 párů bází. Tyto sekvence se dále dělí na mikrosatelity, minisatelity, telomerní repetice a rozptýlené repetice neboli transpozony. Mikrosatelity, minisatelity a telomerní repetice jsou sekvence složené z opakujících se základních jednotek spojených za sebou (tandemově). Transpozony neboli transpozibilní element mohou být jak DNA či RNA a jsou to poloparazitní sekvence, „skákající geny“. Repetitivní sekvence se oproti nerepetitivním sekvencím méně užívají pro určení věku. Jejich využití však popsala například Giacconi *et al.*, 2019.

3.4.2. Tandemové repetice

Skupina tandemových repetice se skládá z mikrosatelitních, minisatelitních a telomerních repetice. Rozdíl mezi mikro- a minisatelitními repeticemi je délka jejich sekvence a četnost výskytu v genomu. Mikrosatelitní repetice, sekvence dlouhé <5 párů bází, jsou nejhojnějšími tandemovými repeticemi v lidském genomu. Minisatelitní repetice jsou oproti mikrosatelitním repeticím delší (>5 bp) a jejich výskyt v genomu je nižší. Telomerní repetice se vyskytují výhradně na telomerách, mají velikost 2-50 kb a jsou charakterizovány sekvencí bází CCCTAA/TTAGGG (Liao *et al.*, 2023).

3.4.3. Transpozony

Transpozony se vyskytují jak na DNA, tak na RNA řetězci. RNA transpozony využívají proces cut-and-paste. Je to proces, při kterém se enzymaticky transpozon vystříhne ze svého původního místa a je vložen na místo jiné prostřednictvím RNA intermediátu – transpozon se přepíše do formy RNA, která je poté reverzně transkribována zpět do DNA, která se integruje do genomu. Cut-and-paste využívají k přemístění i DNA transpozony, ovšem bez meziprojektu RNA (Liao *et al.*, 2023).

RNA transpozony (retrotranspozony) mohou být rozděleny na *Long Terminal Repeats* (LTRs), *Long Interspersed Nuclear Elements* (LINEs) a *Short Interspersed Nuclear Elements* (SINEs). LTRs se vyznačují dlouhými terminačními repeticemi na svých koncích. Spekuluje se, že evolučně tyto repetice pocházejí z infekcí způsobených retroviry. LINEs mají ve své struktuře promotor, který indukuje transpozici endonukleázou a reverzní transkriptázou. Na LINE transpozomech jsou závislé SINE transpozice. Do RNA transpozonů spadají také Alu repetice, které mají regulační funkci (polyadenylační signály) v genomu primátů. Alu inserce způsobují mnoho lidských patologií jako například rakovinu prsu či predispozici k obezitě (Liao *et al.*, 2023).

Retrotranspozony jsou tandemové repetice využívající meziproduct RNA jako prostředek k přepisu a vložení do genomu. Tyto repetice lze rozdělit do dvou skupin – LTR (*Long-Terminal Repeats*) a non-LTR. Non-LTR retrotranspozony se dále dělí na LINE (*Long Interspersed Elements*) a SINE (*Short Interspersed Elements*). Alu repetice jsou specifické pro primáty a se svojí délkou přibližně 300 bp a zastoupením kolem 11 % celé lidské DNA se řadí mezi SINE transpozony. Dříve byly Alu sekvence považovány za „junk DNA“, která nemá žádný funkční smysl. Nové výzkumy prokázaly, že hrály velkou roli v evolučním vývoji primátů a genomové architektuře, ovlivňující genovou expresi a stabilitu genomu.

Inserce Alu elementu poblíž genu může ovlivnit expresi genu (Deininger, 2011). Alu repetice mohou působit rušivě v chodu exprese a funkce genů, proto jsou regulovány epigenetickými procesy, a to převážně DNA metylací v místech bohatých na CpG dinukleotidy a histonovou modifikací. Jejich metylační profil je tkáňově specifický a jejich snížená metylace je spojena s nádorovými onemocněními. Pokud se endogenně buňka ošetří chaetocinem, který inhibuje SUV39 metyltransferázu odpovědnou za metylaci histonu H3K9, dojde k zvýšení exprese Alu repetice. To znamená, že metylace tohoto histonu reguluje Alu repetice inhibicí jejich exprese (Varshney *et al.*, 2015). Bylo prokázáno, že ztráta těchto regulačních procesů (vlivem stárnutí, senescence, stresu) vede k chorobám jako je rakovina, diabetes nebo osteoporóza (Larsen *et al.*, 2018).

DNA transpozony můžeme rozdělit do podrodin podle jejich struktury na „*Miniature Inverted-Repeat Transposable Elements*“ (MITEs), *Mavericks* a *Cryptons*. MITEs se vyskytují na nekódujících regionech zvířecí i rostlinné DNA a mají schopnost pozměnit strukturu a funkci genu. *Cryptons* využívají tyrosin-

rekombinázu umožňující vystřihnout a opět vložit DNA molekulu. Mavericks jsou oproti ostatním transpozonom delší a jsou přítomny spíše v DNA nižších živočichů. V posledních letech se zkoumají jejich homologie k virové DNA. DNA transpozony jsou charakterizovány terminálními invertovanými opakujícími se sekvencemi (TIR), které se nacházejí na obou koncích transposonu a jsou vzájemně komplementární (Liao *et al.*, 2023).

3.5. Metody detekce metylace

K detekci globální metylace dříve sloužila kapalinová chromatografie, která ovšem postrádala specifitu. Navzdory řešení tohoto problému různými instrumentálními modifikacemi, jako je zavedení fluorescence nebo hmotnostní spektrometrie, se od této metody upustilo.

Následně byla zavedena metoda založená na elektroforetické separaci, která následovala po PCR reakci specifickou pro metylovanou DNA po bisulfitární konverzi. V 90. letech minulého století byly zavedeny metody využívající restrikční enzymy, izotopové značení a následnou elektroforézu. Data z této analýzy poté byly porovnávány s databází. Od těchto metod bylo upuštěno kvůli náročnosti jak technické, tak časové. K moderní analýze metylace DNA byly vyvinuty metody, které v prvním kroku připraví DNA tak, aby metylace byla detekována v dalším kroku. V dnešní době se využívají metody s použitím endonukleáz, imunoprecipitace a konverze bází (Sun, Zhu, 2022).

3.5.1. PCR metody s využitím restrikčních endonukleáz

V minulosti byly restrikční endonukleázy citlivé pro metylaci (MREs) používány k fragmentaci DNA. Byly to nejčastěji enzymy *MspI* (rozeznával sekvence CCGG) a *HpaII* (rozlišoval, zda jsou tyto sekvence metylované nebo nikoliv). Získané fragmenty byly sekvenovány pro analýzu jejich metylačních profilů.

V roce 2010 byla vyvinuta metoda MRE-seq (sekvenace za použití MRE), která kombinuje tři endonukleázy a umožňuje určit metylační status jednotlivých bází.

Výhodou MRE-seq je relativně levné provedení pro široké pokrytí metylačního statusu. Mezi její nevýhody patří neúplné pokrytí genomu a tím sekvenční zkreslení dané (ne)přítomností restrikčních míst, citlivost na metylační hustotu, ztráta metylačního kontextu (CpA, CpT, CpC), ztráta kvantifikační informace, artefakty

způsobené neúplným štěpením enzymem anebo naopak hvězdičkovou aktivitou enzymu, a hlavně požadavek na velké vstupní množství DNA (Roberts *et al.*, 2003). Pokud chceme rozštěpit celou genomovou DNA nebo RNA pomocí endonukleáz, musíme použít mnoho různých endonukleáz, každou specifickou pro určitou sekvenci. Tuto metodu lze kombinovat s PCR a elektroforetickou separací (Sun, Zhu, 2022).

3.5.2. Metody s využitím afinity

V roce 2005 byla vyvinuta metoda na bázi interakce metylované DNA a protilátky. Imunoprecipitace metylované DNA (MeDIP) spočívá v ošetření DNA protilátkou specifickou pro 5mC. Jako modifikace se může použít i protilátka specifická pro deriváty 5mC, jako například 5hmC. Sekvenací protilátkami-vychytané DNA (MeDIP-seq) bylo dosaženo rozlišení 100-300 bází.

Pro sekvenaci CpG regionů byla vyvinuta metoda MDB-seq, která využívá afinitu proteinů rodiny MDB k CpG nukleotidům. Tato metoda je schopna analyzovat i sekvence s nižším zastoupením CpG dinukleotidů, proto je v dnešní době využívána pro detekci metylace v celém genomu. Není však schopna detekovat metylaci jednotlivé báze (Sun, Zhu, 2022).

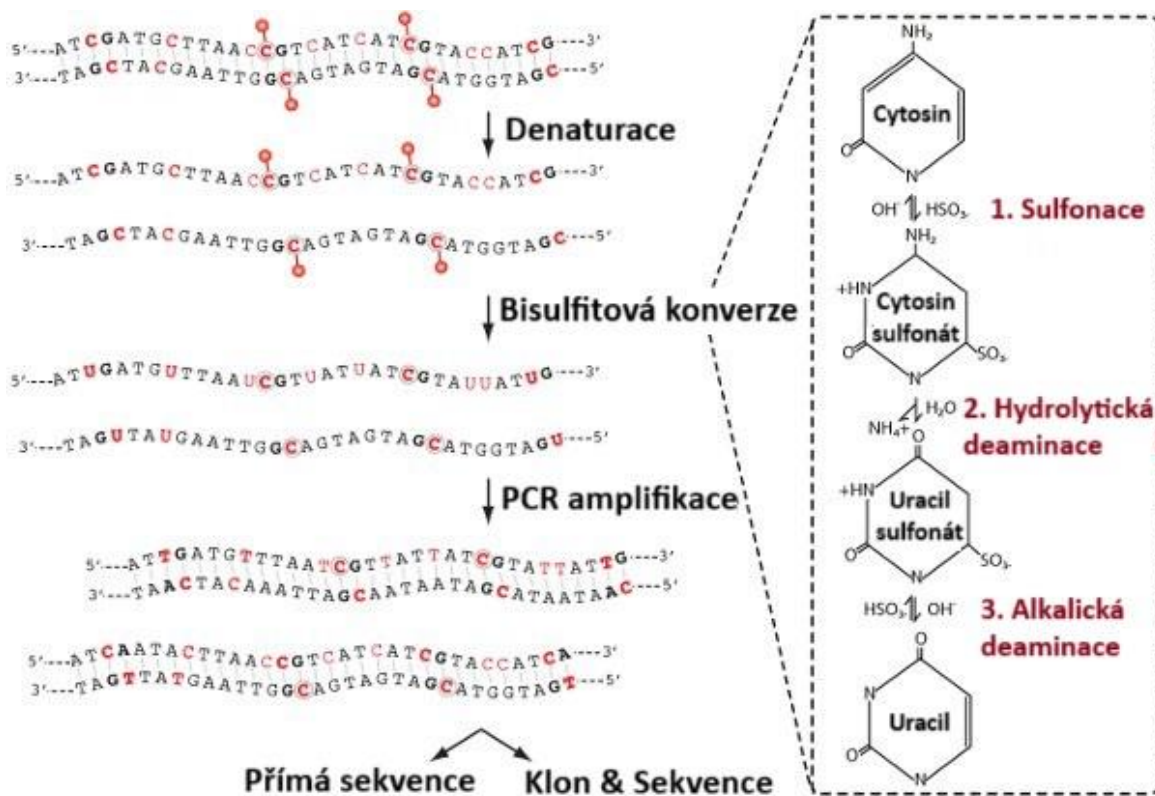
3.5.3. Metody s využitím bisulfitové konverze

Nejrozšířenější způsoby detekce metylace jsou s využitím bisulfitové konverze, která umožňuje chemicky rozlišit metylovaný a nemetylovaný cytosin.

Bisulfitová konverze je třístupňová reakce. Denaturovaná jednovláknová DNA (ssDNA) podléhá sulfonaci navázáním hydrogensířičitanového aniontu (HSO_3^-) na pozici šestého uhlíku cytosinu za vzniku 5,6-dihydrocytosin-6-sulfonátu. V kroku hydrolytické ireverzibilní deaminace je z 5,6-dihydrocytosin-6-sulfonátu hydrolyticky odštěpena aminoskupina za vzniku 5,6-dihydrouracil-6-sulfonátu. V posledním kroku desulfonace probíhá alkalické odštěpení hydrogensířičitanového aniontu hydroxidovým aniontem za vzniku uracilu.

Cytosinová báze, která je metylovaná, nepodléhá této reakci. Následuje PCR, kdy je vzniklý uracil na základě komplementarity s adeninem amplifikován jako tyminová báze. Metylovaný cytosin je amplifikovaný jako cytosin (Patterson *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2012).

Na **Obrázku 3** je znázorněn průběh bisulfitové reakce.



Obrázek 3: Průběh bisulfitové konverze nemetylovaného cytosinu na uracil. (Převzato a upraveno z Patterson *et al.*, 2011).

Celogenomová bisulfitová sekvenace (WGBS) je schopna detekovat metylaci s rozlišením jedné báze a je využívána pro analýzu celého genomu. Bisulfitová konverze přeměňuje nemetylované cytosiny na uracil, které jsou PCR reakcí amplifikovány jako thymin, zatímco metylované cytosiny jsou dále amplifikovány jako cytosin. Amplifikovaná DNA po bisulfitové konverzi je poté sekvenována. Výhoda této metody spočívá ve vysoké specificitě, velkém rozlišení a malé časové náročnosti. Nevýhodou je potřeba velkého množství vstupní DNA kvůli jejím ztrátám při bisulfitové reakci. Probíhají snahy o řešení tohoto problému metodou tagmentace, přidáním Tn5 transponázy a sekvenačních adaptorů, což má za následek snížení potřebného množství vstupní DNA a snížení ztrát (Sun, Zhu, 2022).

3.5.4. PCR metody bez nutnosti využití bisulfitové konverze

V roce 2019 byla vyvinuta metoda TET-asistované pyridin boranové sekvenace (TAPS) schopna rozlišit metylaci s rozlišením na jedinou bázi v rámci celého genomu.

V rámci této analýzy je 5mC a 5hmC oxidován na 5caC, který je následně redukován na dihydrouridin (DHU), jež je dále PCR reakcí konvertován na thyminové báze. Nemetylované cytosiny jsou ponechány, tak jak jsou. Tímto způsobem může být metylace pomocí následné sekvenace kvantifikována. Další adaptací této metody je enzymatické využití deaminázy A3A. Tento enzym není schopen deaminovat substrát vytvořený z 5mC a 5hmC pomocí TET2 a T4-βGT proteinů. Nemetylované cytosiny jsou deaminovány A3A enzymem na uracil a PCR reakcí amplifikovány na thymin. Vzorky jsou následně sekvenovány. Tato metoda sice snižuje potřebné množství vstupní DNA, ale způsobuje také nerovnoměrné pokrytí analýzy genomu a zvýšenou degradaci bází (Sun, Zhu, 2022).

3.5.5. Detekce metylace sekvenací metodou z jedné buňky

V posledních letech se stále více rozvíjejí metody umožňující sekvenaci epigenomu jednotlivých buněk, s důrazem na epigenetickou heterogenitu buněk stejného typu.

V roce 2013 byly vyvinuty single-cell *Reduced Representation Bisulfite Sequencing* metody (scRRBS). Jedním z přístupů k minimalizaci ztrát DNA těchto metod v krocích PCR reakcí je soustředění reakčních kroků do jediné zkumavky a využití preamplifikace. Po lýzi buněk a bisulfitové reakci jsou přidány hexamerní primery, které nespecificky amplifikují řetězec DNA. Tato metoda umožňuje přidáním pěti pre-amplifikačních cyklů zvýšit pokrytí genomu až na 48,4 % CpG míst a nabízí možnost detailnějšího zkoumání epigenetických změn na úrovni jednotlivých buněk (Sun, Zhu, 2022).

V dalším vývoji byla tato metoda dále modifikována kombinací jednobuněčného štěpení MSRE a multiplex PCR, což umožnilo zvýšit počet analyzovaných CpG míst a snížit ztráty DNA při bisulfitové reakci. Tato upravená metoda, nazvaná jednobuněčná restriční analýza metylace (SCRAM) umožňuje detailnější zkoumání epigenetické heterogenity v populaci buněk stejného typu a poskytuje cenné informace o epigenetických změnách na úrovni jednotlivých buněk. Není však vhodná pro analýzu celého genomu, protože vyžaduje více specifických primerů pro jednotlivá CpG místa.

Novým přístupem k epigenetickému zkoumání je kombinace jednotlivých omik (zvláště pro identifikaci rakovinných buněk). Například pomocí biotylovaných oligo-dT primerů, konjugovaných na magnetické kuličky, jsou separovány mRNA a DNA, a pak je profilován metylom a transkriptom (scM&T-seq). Nebo je možno

omickými metodami analyzovat chromatin a určit stav metylace sekvenací metylomu (scNOMe-seq) (Sun, Zhu, 2022).

3.5.6. Metody s využitím sekvenace nové generace

Epigenetické změny jako DNA metylace jsou ve forenzních vědách významným biomarkerem určení věku. Bylo vytvořeno několik predikčních modelů věku založených na metodě pyrosekvenování, využívající vzorky DNA z krve. Tato metoda vyžaduje pouze malé množství analyzovaných CpG ostrůvků, což je pro forenzní využití ideální. Predikční modely vykazují celkem vysokou přesnost (odchylka se pohybuje kolem 3-5 let). V roce 2019 Daunay *et al.* provedl experiment, kdy na základě 6 modelů predikce věku (Bekaert, Park, Thong, Weidner, Zbieć-Piekarska 1 a Zbieć-Piekarska 2) pomocí metody pyrosekvenování otestoval celkově 100 vzorků krve individuálních jedinců ve věku od 19 do 65 let. Nejlepší odhad věku přinesl model Bekaert a Thong s odchylkou (MAD) 4,5 a 5,2 let. Nejmenší přesnost ukázal model Zbieć-Piekarska 2 (MAD = 10,5 let) (Daunay *et al.*, 2019).

Kromě pyrosekvenace se využívá také masivně paralelní sekvenování (MPS), jež se zdá být velice slibnou metodou v kontextu detekce metylace pro určení věku. Ve studii Naue *et al.* bylo sekvenováno celkově 208 jedinců jako trénovací sada a 104 jedinců jakožto testovací sada. Byla využita metoda PCR, bisulfitové reakce a sekvenace na sekvenátoru MiSeq pomocí kytu od společnosti Illumina. Pro tento experiment bylo využito 13 lokusů jakožto markerů pro určení věku. Výsledkem byl odhad věku jedinců s odchylkou v průměru 3,2 let a se střední kvadratickou chybou (RMSE) 3,9 let, což jsou příznivé výsledky pro forenzní využití (Naue *et al.*, 2017).

Současným state-of-the-art forenzního určení věku pomocí detekce metylace je požadavek na vstupní množství DNA v jednotkách desítek nanogramů, což je zásadní nepoměr k tomu, co je detekovatelné pomocí metod profilování DNA (stačí desítky pikogramů) a jaké množství DNA je ponecháno ve stopě zločincem při páčání trestného činu (stovky pikogramů při dotkových stopách).

Cílem této práce je proto zkoumat možnosti snížení množství vstupní DNA potřebného pro stanovení věku pomocí detekce metylace cytosinu. **Hlavní hypotézou je, že místo testování nerepetitivních sekvencí lze efektivněji využít repetitivních sekvencí, což umožní detekci více cílů v rámci jediné buňky a přirozené zesílení signálu.** Tato hypotéza bude podrobněji testována formou odpovědí na dílčí otázky, jež tato práce bude experimentálně zkoumat.

Jsou Alu repetice vhodné pro stanovení věku?

Alu repetice se vyskytují ve velké míře po celém genomu v kopiích v řádu statisíců. Tyto sekvence podléhají metylaci, jejíž míra a profil se s věkem člověka mění. Tato fakta dělají z Alu repetice potenciálně vhodný marker pro určování věku.

Je metylace v souvislosti s věkem specifická pro určité podrodiny Alu nebo pro Alu repetice celkově?

Většina Alu repetice vykazuje velkou míru metylace, ale její profil závisí na specifické tkáni a na umístění v genomu. Některé podrodiny (např. AluYa5) vykazují značnou hypometylací (Bakshi et al., 2016).

Lze rozlišit Alu podrodiny pomocí PCR po bisulfitační reakci?

Bisulfitační reakce ztěžuje návrh PCR primerů kvůli změnám v DNA, konkrétně kvůli konverzi cytosinu na uracil. Je možné, že pro některé podrodiny Alu se nepodaří úspěšně provést design primerů, takže tyto podrodiny vůbec nebudou amplifikovány. Stejně tak je možné, že některé podrodiny budeme muset sloučit na úrovni použitých primerů. Sloučení podrodin může vést až ke generické amplifikaci všech Alu sekvencí, kdy je otázkou, zda budou rozlišitelné bioinformaticky.

Lze sekvenovat Alu podrodiny pomocí masivně paralelního sekvenování?

Masivně paralelní sekvenování umožňuje detailní analýzu genomu včetně repetitivních sekvencí. Touto metodou můžeme s velkou citlivostí analyzovat mnoho CpG míst najednou (Salameh, Bejaoui, El Hajj, 2020), což teoreticky dovoluje detailní profilaci metylačních vzorců napříč Alu podrodinami. Vzhledem k přístrojové dostupnosti je v současné době pro forenzní účely vhodnější než pyrosekvenování.

Pro zodpovězení těchto otázek byl zvolen následující postup: **v literatuře nalézt a designovat primerové páry pro amplifikaci Alu podrodin po bisulfitaci, tyto primerové páry optimalizovat natolik, aby se s jejich pomocí dala vytvořit knihovna pro masivně paralelní sekvenování s využitím tagmentace.**

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Biologický materiál

K experimentu byla použita DNA izolována z krve tří mladých a čtyř starších lidí, která byla poskytnuta se souhlasem etické komise FNOL a LF UP pod číslem 119/18. Věk dárců se u starších jedinců pohybuje od 85-90 let a u mladých kolem 5 let. Přehled vzorků je znázorněn v **Tabulce 1**. Kromě těchto vzorků byl k testování poskytnut 8. vzorek DNA jedince ve věku 54 let.

Tabulka 1: Seznam poskytnutých vzorků DNA, jejich značení a věk dárců

Číslo vzorku	Označení vzorku DNA	Věk dárce
1	22-0227-13940	5
2	22-0749-14571	5
3	22-0726-14541	5
4	23-0032-15454	90
5	23-0554-14338	87
6	23-0195-15643	86
7	22-0428-14190	85

4.2. Použité chemikálie a reagenty

- Bisulfite Converted Human DNA Standard, 1 µg/50 µl (Zymo Research)
- CpGenome™ human methylated DNA standard
- MasterMix Qiagen z HotStarTaq Plus MasterMix (Qiagen)
- PCR Buffer, 10x (Qiagen)
- HotStarTaq DNA polymerase, 5 U/µl (Qiagen)
- 25 nM DNA oligonucleotides (dNTPs) (IDT)
- EvaGreen® Dye, 20X in water (Biotium)
- DEPC H₂O (Qiagen)
- Etanol (98%, 75%)
- Primerové směsi PM 696, 697, 698, 699, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 189, 190, 400, 401

4.3. Spotřební materiál

- PCR zkumavky 1,5 ml (Axygen)
- Špičky s dojitým filtrem, objemy 10, 20, 100, 200, 1000 μ l (Eppendorf)
- Mikrozukavky pro PCR s plochým víčkem 0,2 ml (P-LAB)
- Sběrací zkumavky 2 ml (P-LAB)
- PCR stripy (BIO-plastics)

4.4. Pomůcky

- 0,1 – 2,5 μ l mikropipeta (Eppendorf)
- 0,5 – 10 μ l mikropipeta (Eppendorf)
- 2 – 20 μ l mikropipeta (Eppendorf)
- 10 – 100 μ l mikropipeta (Eppendorf)
- 20 – 200 μ l mikropipeta (Eppendorf)
- 100 – 1000 μ l mikropipeta (Eppendorf)
- Chladicí stojan na zkumavky (P-LAB)
- Stojan na pipety (Eppendorf)

4.5. Použité kity

- Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific)
- QIAquick® PCR purification Kit (Qiagen)
- EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research)
- Nextera XT DNA Library preparation kit (Illumina)

4.6. Laboratorní přístroje

- Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen)
- LightCycler® 480 II (Roche)
- Minicentrifuga MiniSpin (Eppendorf)
- Laminární box Mars Safety Classe 2 (LaboGene)
- MasterCycler Nexus Thermal cycler (Eppendorf)
- 4200 TapeStation systém (Agilent)
- Centrifuge 5430 (Eppendorf)
- Vortex V-1 plus (Biosan)

4.7. Software

- BiSearch
- BioEdit
- PrimerSuite

4.8. Metodika

4.8.1. Izolace DNA

Izolace DNA ze vzorků krve byla provedena pracovníky ÚMTM pomocí izolátoru MagCore MF, cat. no. MCA1601 dle protokolu dodavatele. Příložená cartridge obsahovala eluční pufr a magnetické kuličky. Do reakce byla dodána proteinkináza K a nosná RNA. Vzorky byly umístěny do zkumavky s filtrem a víčkem. Celkový eluční objem byl 30 μl H_2O . Celý automatizovaný proces extrakce trvá 120 minut.

Touto metodou byla izolována DNA ze vzorků krve čtyř starých (85–90 let) a tří mladých jedinců (~5 let), která byla využita v následujících experimentech.

4.8.2. Fluorometrická kvantifikace DNA pomocí Qubit dsDNA HS Assay kitu

Koncentrace DNA byla změřena pomocí Qubit dsDNA HS Assay kitu:

- 1) Standardy se nechaly vytemperovat při laboratorní teplotě 30 minut, Qubit HS reagent byl zvortexován.
- 2) V příložené zkumavce byl připraven vzorek standardu smícháním 189 μl Qubit HS pufru a 1 μl Qubit HS reagentu + 10 μl Qubit HS standardu #1/#2
- 3) 197 μl Qubit HS pufru, 1 μl HS reagentu a 2 μl vzorku DNA bylo smícháno ve zkumavce určené pro fluorometrii.
- 4) Smíchané vzorky byly zvortexovány a inkubovány 2 minuty při laboratorní teplotě.
- 5) V menu fluorometru Qubit 2.0 byla nastavena možnost „DNA“: „dsDNA High Sensitivity“ a následně „Read new standards“.
- 6) Byl proměřen standard #1 a #2, poté pomocí tlačítka „Read“ byly načteny jednotlivé vzorky.
- 7) V rozhraní „Calculate stock concentration“ byla zvolena jednotka ng/ μl a množství vstupního vzorku 2 μl .
- 8) Byla naměřena hodnota koncentrace jednotlivých vzorků.

4.8.3. Bisulfitová konverze

Izolovaná DNA byla podrobena bisulfitové konverzi pomocí EZ DNA-Methylation-Gold kitu (Zymo research) dle přiloženého návodu:

- 1) Byl připraven CT Conversion reagent: zkumavka CT byla stočena (19360 g), následně do ní bylo přidáno 900 μ l vody, 300 μ l M-Dilution pufru a 50 μ l M-Dissolving pufru.
- 2) Smíchaný roztok byl zvortexován a inkubován 10 minut při laboratorní teplotě.
- 3) Do PCR zkumavky bylo napipetováno 130 μ l z připraveného roztoku a 20 μ l DNA, směs byla promíchána pipetováním a následně stočena na 19360 g.
- 4) Vzorky byly umístěny do termocykléru a byl spuštěn program (viz **Tabulka 9**).

Tabulka 9: Protokol termocykléru pro bisulfitovou reakci

98 °C	10 min.
64 °C	150 min.
4 °C	až 20 hod.

- 5) Byl připraven M-Wash pufr smícháním 1,2 mL M-Wash koncentrátu a 4,8 mL 100% EtOH; směs byla následně zvortexována.
- 6) Na přiloženou Zymo-Spin kolonu umístěnou ve sběrné zkumavce bylo naneseno 600 μ l M-Binding pufru. Vzorek (150 μ l) bylo naneseno na kolonu a promícháno převrácením zkumavky.
- 7) Vzorek byl centrifugován 1 minutu na 19360 g, poté byla sběrná zkumavka vyprázdněna.
- 8) Na kolonu bylo naneseno 100 μ l M-Wash pufru, poté byla zopakována centrifugace po dobu 1 minuty.
- 9) Na kolonu bylo naneseno 200 μ l M-Desulphonation pufru.
- 10) Vzorek se nechal inkubovat 15-20 minut při laboratorní teplotě, následovala centrifugace po dobu 1 minuty.

- 11) Na kolonu bylo nanášeno 200 µl M-Wash pufru, vzorek byl centrifugován 1 minutu a sběrná zkumavka byla vyprázdněna.
- 12) Na kolonu bylo nanášeno 200 µl M-Wash pufru a vzorek byl centrifugován po dobu 1 minutu.
- 13) Kolona byla přenesena na čistou zkumavku.
- 14) Na kolonu bylo nanášeno 10 µl Elution pufru, vzorek byl následně centrifugován 1 minutu.
- 15) Postup byl zopakován pro všech 8 vzorků izolované a kvantifikované DNA (viz kapitola 4.1., **Tabulka 1**).

4.8.4. Návrh primerů

K návrhu primerů byly použity sekvence podrodin Alu repetitív z GenBank, z nich byl následně vytvořen konsenzus pro podrodiny AluY, AluSc a AluJb.

Sekvence jednotlivých podrodin pro návrh primerů:

>AluSc sequence

```
ggccgggcgcggtggctcacgcctgtaatcccagcactttgggaggccgaggcgggcgatcacgaggtcaagagat
cgagaccatcctggccaacatggtgaaacccgtctactaaaaatacaaaaattagctgggcgtggtggcgcgcgcct
gtagtcccagctactcgggaggctgaggcaggagaatcgctgaacccgggaggcggaggtgcagtgagccgagat
cgcgccactgcactccagcctggcgacagagcgagactccgtctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

>AluY sequence

```
ggccgggcgcggtggctcacgcctgtaatcccagcactttgggaggccgaggcgggcgatcacgaggtcaggagat
cgagaccatcctggctaacacggtgaaacccgtctactaaaaatacaaaaattagccgggcgtggtggcgggcgc
ctgtagtcccagctactcgggaggctgaggcaggagaatggcgtgaacccgggaggcggagcttcagtgagccgag
atcgcgccactgcactccagcctggcgacagagcgagactccgtctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

>AluJb sequence

```
ggccgggcgcggtggctcacgcctgtaatcccagcactttgggaggccgaggcgggnggatcgttgagcccaggag
ttcgagaccagcctgggcaacatggcgaaacccgtctcaaaaaatacaaaaattagccgggcgtggtggcgcgc
gcctgtagtcccagctactcgggaggctgaggcgggaggatcgcttgagcccgggaggtcgaggctgcagtgagccg
tgatcgcgccactgcactccagcctggcgacagagcgagaccctgtctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aa
```

Pro tyto sekvence byly mnou navrženy primery, které byly následně i testovány (viz **Příloha 1, Tabulka 4**). Další primery byly vyhledány v literatuře nebo v databázi ÚMTM (již odzkoušené primery), které byly pouze testovány (**Příloha 2, Tabulka 5 a 6**).

V software BioEdit Sequence Alignment Editor byla zhotovena konsenzní sekvence z výše zmíněných sekvencí:

>AluSc, AluY, AluJb consensus sequence

```
GGCCGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCG
AGGCGGGCGGATCRCKWGRKCMVRRGAKYKMGASMMYMSYSKSBMM
AYRKKGMRAMMCCSYSTCTMYWMAAAAWAYAMAAAWWDVBSSGSS
BKBBBBSSSGSSSSYBKDDDBYCMVVBHHHYBSGRRRSBBDRRSVVGRRR
RDHKSBBKDRMSCSSGRRRSSKVRRBKBBVVDKDRVSSVRDDHBSSSSMM
HBBVMHYM VVS YBKSGVSRV MRV RVS RVD MYSYBK YHHMAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Tyto sekvence byly dále použity v software BiSearch a PrimerSuite pro návrh primerů po bisulfitační reakci. Navržené primery jsou uvedeny v **Tabulce 2, Příloha 1**:

4.8.5. Testování primerů navržených v software BiSearch a PrimerSuite

Reakční směs byla připravována ve sterilním prostředí laminárního boxu. Celkový objem jedné reakce byl 10 µl (1 µl PM + 9 µl PCR master-mixu). Bylo testováno celkově 7 PM, a to PM 688, 689, 690, 691, 692, 693, 187. PM 187 pro gen MGMT byl přidán jakožto kontrola, zda PCR reakce probíhá v pořádku.

PM 187: F: CGAATATACTAAAACAACCCGCG
R: GTATTTTTTCGGGAGCGAGGC

K přípravě PCR master-mixu bylo použito:

- 10x PCR buffer HotStartTaq DNA polymerase (QiaGen)
- dNTPs (25 mM each)
- HotStartTaq DNA polymerase
- EvaGreen 20x
- DEPC H₂O
- Metylovaná bisulfitová DNA kontrola
- Nemetylovaná bisulfitová DNA kontrola

Master-mix byl připraven dle **Tabulky 3**:

Tabulka 2: Obsah PCR master-mixu pro testování navržených PM

Reagencie	Ředící faktor	14 reakcí [μl]
10x PCR buffer HotStartTaq DNA polymerase (QiaGen)	10	19,2
dNTPs (25 mM each)	125	1,5
HotStartTaq DNA polymerase	25	7,7
EvaGreen 20x	40	4,8
DEPC H ₂ O		131,1
Celkem		164,3

Po smíchání a zvortexování bylo do dvou zkumavek napipetováno po 70,2 μl master-mixu. Do jedné zkumavky bylo napipetováno 3,5 μl metylované bisulfitované DNA kontroly a do druhé zkumavky 3,5 μl nemetylované bisulfitované kontroly.

Primerové směsi byly naředěny 20x (0,5 μl PM + 9,5 μl DEPC H₂O) a byly připraveny dva PCR stripy. Do jednoho PCR stripu bylo napipetováno do každé zkumavky 9 μl PCR master-mixu s metylovanou bisulfitovanou DNA a do druhého stripu 9 μl PCR master-mixu s nemetylovanou bisulfitovanou DNA do každé zkumavky. Následně byl do jedné zkumavky z každého PCR stripu napipetován 1 μl stejného naředěného PM (2×7). PCR stripy byly následně nasazeny na PCR reakci dle **Tabulky 4**.

Tabulka 3: PCR protokol pro testování navržených primerů

PCR program	Teplota [°C]	Čas		
Predenaturace	95	15 min.		
Denaturace	94	15 s	15 cyklů Touchdown -1 °C/cyklus	Sběr fluorescenčního signálu ve FAM kanálu
Annealing a elongace	65	30 s		
Elongace	72	60 s		
Denaturace	94	15 s		
Annealing a elongace	51	30 s	35 cyklů	Sběr fluorescenčního signálu ve FAM kanálu
Elongace	72	60 s		
Parking	4	∞		

4.8.6. Testování primerů nalezených v literatuře a dalších navržených primerů

Primerové směsi 696, 697, 698 a 699 byly dodatečně navrženy v software PrimerSuite. K těmto primerům byly do dalšího experimentu vybrány PM 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 189, 190, 400 a 401 (viz **Tabulka 5** a **6, Příloha 2**).

K přípravě PCR master-mixu pro 17 reakcí bylo použito:

- 10x PCR buffer HotStartTaq DNA polymerase (QiaGen)
- dNTPs (25 mM each)
- HotStartTaq DNA polymerase
- EvaGreen 20x
- DEPC H₂O
- Metylovaná bisulfitová kontrola

Master-mix byl připraven dle **Tabulky 7**:

Tabulka 7: Obsah PCR master-mixu pro testování primerů z literatury a „úspěšných“ primerů

Reagencie	Ředící faktor	17 reakcí [μl]
10x PCR buffer HotStartTaq DNA polymerase (QiaGen)	10	19,9
dNTPs (25 mM each)	125	1,6
Metylovaná bisulfitová kontrola	30	6,7
HotStartTaq DNA polymerase	25	8
EvaGreen 20x	40	4,9
DEPC H ₂ O		138,3
Celkem		179,4

Primerové směsi byly naředěny 20x (0,5 μl PM + 9,5 μl DEPC H₂O) a byly připraveny tři PCR stripy. Po smíchání reagensů v 2ml zkumavce byl master-mix zvortexován. Do 17 zkumavek PCR stripů bylo napipetováno 9 μl připraveného master-mixu. Do každé z těchto zkumavek byl napipetován jeden z testovaných PM

po 1 μ l. PCR stripy byly krátce stočeny na centrifuze a poté nasazeny na PCR reakci dle **Tabulky 8**.

Tabulka 8: PCR protokol pro testování úspěšných PM a primerů z literatury

PCR program	Teplota [°C]	Čas		
Predenaturace	95	15 min.		
Denaturace	94	15 s	10 cyklů Touchdown -1 °C/cyklus	Sběr fluorescenčního signálu ve FAM kanálu
Annealing a elongace	70	30 s		
Elongace	72	60 s		
Denaturace	94	15 s		
Annealing a elongace	60	30 s	35 cyklů	Sběr fluorescenčního signálu ve FAM kanálu
Elongace	72	60 s		
Parking	4	∞		

4.8.7. Optimalizace primerů

Cílem tohoto experimentu bylo vyřadit méně úspěšní, nespolehlivé primery. Pro tento experiment byly zvoleny PM 696, 697, 698, 699, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 189, 190, 400 a 401. Směsi z předešlého experimentu, o nichž bylo předpokládáno, že amplifikují Alu sekvence metylované bisulfitové kontroly, konkrétně PM 700, 701 a 702 byly vyřazeny, protože nevykazovaly žádnou amplifikaci, nebo byl jejich crossing point (Cp) moc vysoký. Tyto PM byly testovány na metylované bisulfitované DNA č. 8.

K přípravě PCR master-mixu pro 14 reakcí bylo použito:

- 10x PCR buffer HotStartTaq DNA polymerase (QiaGen)
- dNTPs (25 mM each)
- HotStartTaq DNA polymerase
- EvaGreen 20x
- DEPC H₂O
- Metylovaná bisulfitová DNA č. 8

Master-mix byl připraven dle **Tabulky 10**:

Tabulka 10: Obsah PCR master-mixu pro optimalizaci primerů

Reagencie	Ředící faktor	14 reakcí [μl]
10x PCR buffer HotStartTaq DNA polymerase (QiaGen)	10	16,4
dNTPs (25 mM each)	125	1,3
Metylovaná bisulfitová kontrola	30	5,5
HotStartTaq DNA polymerase	25	6,6
EvaGreen 20x	40	4,0
DEPC H ₂ O		113,9
Celkem		147,7

Jednotlivé PM byly 20x naředěny (9,5 μl H₂O + 0,5 PM); tato směs byla označena a zamrzána, PM vykazující vyšší amplifikaci byly zředěny ještě 10x (celkem 200x), tzn. PM 698, 704, 705, 706, 708, 190. Již zředěné PM byly zředěny následovně: 9 μl H₂O + 1 μl PM.

Do dvou PCR stripů byl napipetován PCR master-mix, tzn. 14×9 μl. Do každé reakční zkumavky s master-mixem byl přidán 1 μl naředěného PM. Stripy krátce stočeny nasazeny na PCR reakci podle **Tabulky 11**:

Tabulka 11: PCR protokol pro optimalizaci primerů

PCR program	Teplota [°C]	Čas		
Pre-denaturace	95	15 min.		
Denaturace	94	15 s	15 cyklů Touchdown -1 °C/cyklus	Sběr fluorescenčního signálu ve FAM kanálu
Annealing a elongace	65	30 s		
Elongace	72	60 s	Analýza křivky tání	
Before-melt	50			
Melting target	95			
Denaturace	94	15 s		
Annealing a elongace	51	30 s	35 cyklů	Sběr fluorescenčního signálu ve FAM kanálu
Elongace	72	60 s		
Parking	4	∞		

4.8.8. Testování optimalizovaných primerů na bisulfitované DNA mladých a starých jedinců

Vyizolovaná DNA 7 dárců (č. 1-7, viz **Tabulka 7**) po bisulfitové konverzi bylo podrobena qPCR reakci pomocí 10 optimalizovaných primerových směsí (viz **Tabulka 11**). Bylo připraveno celkem 70 vzorků (10 PM × 7 vzorků DNA dárců).

K přípravě PCR master-mixu pro 10 reakcí bylo použito:

- 10x PCR buffer HotStartTaq DNA polymerase (QiaGen)
- dNTPs (25 mM each)
- HotStartTaq DNA polymerase
- EvaGreen 20x
- DEPC H₂O

- Vzorek izolované bisulfitované DNA dárců (1-7)

Master-mix byl připraven dle **Tabulky 12**:

Tabulka 12: Obsah PCR master-mixu pro 10 reakcí

Reagencie	Ředící faktor	10 reakcí [μl]
10x PCR buffer HotStartTaq DNA polymerase (QiaGen)	10	11,7
dNTPs (25 mM each)	125	0,9
Vzorek bisulfitované DNA (1-7)	30	3,9
HotStartTaq DNA polymerase	25	4,7
EvaGreen 20x	40	2,9
DEPC H ₂ O		81,4
Celkem		105,5

Postup dle **Tabulky 12** byl proveden 7krát, pokaždé s jiným vzorkem DNA.

Jednotlivé PM byly následně 20x naředěny (9,5 μl H₂O + 0,5 PM). Primerové směsi PM 704, 705, 706, 708, 190 byly zředěny ještě 10x (celkem 200x), tzn. 9 μl H₂O + 1 μl PM.

Do devíti PCR stripů byl napipetován PCR master-mix, tzn. 70×9 μl. Do každé reakční zkumavky s master-mixem byl přidán 1 μl naředěného PM. Stripy krátce stočeny nasazeny na PCR reakci podle **Tabulky 13**:

Tabulka 13: Protokol qPCR reakce pro amplifikaci dárcovské bisulfitované DNA pomocí optimalizovaných primerů

PCR program	Teplota [°C]	Čas		
Predenaturace	95	15 min.		
Denaturace	94	15 s	15 cyklů Touchdown -1 °C/cyklus	Sběr fluorescenčního signálu ve FAM kanálu
Annealing a elongace	65	30 s		
Elongace	72	60 s	Analýza křivky tání	
Before-melt	50			
Melting target	95			
Denaturace	94	15 s		
Annealing a elongace	51	30 s	35 cyklů	Sběr fluorescenčního signálu ve FAM kanálu
Elongace	72	60 s		
Parking	4	∞		

4.8.9. Fluorometrická kvantifikace a tvorba poolů

Po qPCR amplifikaci byly obdobným způsobem jako v kapitole 4.3.6. amplikony fluorometricky kvantifikovány pomocí Qubit dsDNA HS Assay kitu.

Následně byly amplikony ekvimolárně smíchány, objemy jednotlivých napipetovaných PM jsou uvedeny v **Tabulce 14**.

Tabulka 14: ekvimolární smíchání poolů: objemy jednotlivých PM příslušné DNA přidaných do poolů.

PM	č. vzorku DNA						
	1	2	3	4	5	6	7
	Objem PM [μ l]						
703	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
704	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
705	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
706	5,0	5,0	1,0	1,0	1,0	5,0	1,0
707	1,5	5,0	5,0	5,0	5,0	1,5	5,0
708	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
189	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
190	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
400	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
401	1,5	5,0	5,0	5,0	5,0	1,5	5,0

4.8.10. Přečištění poolů

Ekvimolárně smíchané pooly byly přečištěny pomocí QIAquick Purification kitu dle přiloženého návodu.

- 1) Smíchané vzorky byly smíchány s pětinasobným množstvím PB pufru (50 μ l na vzorek) a promíchány pipetováním.
- 2) Vzorky byly přeneseny na kolony umístěné ve sběrné zkumavce a centrifugovány jednu minutu při 13 000 rpm (19 000 g).
- 3) Na kolony bylo přidáno 750 μ l PE pufru, následovala centrifugace 1 minutu při 13 000 rpm (19 000 g).
- 4) Sběrné zkumavky byly vyprázdněny. Kolony se vzorky byly opět centrifugovány 1 minutu při 13 000 rpm (19 000 g) pro odstranění zbytků PE pufru.
- 5) Kolony byly umístěny do nových 1,5mL zkumavek.
- 6) Na kolony bylo nanášeno 20 μ l DEPC H₂O a po jedné minutě byly vzorky opět centrifugovány jednu minutu při 13 000 rpm (19 000 g).

Všech 7 přečištěných poolů bylo následně kvantifikováno fluorometricky pomocí Qubit dsDNA HS Assay kitu stejným postupem jako v předchozích měřeních. Poté byly pooly naředěny na koncentraci 0,5 ng/μl viz **Tabulka 15**.

Tabulka 15: Schéma naředění poolů na koncentraci 0,5 ng/ μl

Číslo poolu	Objem vzorku [μl]	Objem H ₂ O [μl]
1	7,3	2,7
2	1,9	8,1
3	2,6	7,4
4	3,1	6,9
5	4,9	5,1
6	2,5	7,5
7	6,1	3,9

4.8.11. Příprava knihoven

K přípravě knihoven byl použit Nextera XT DNA Library preparation kit.

- 1) V 0,2mL zkumavkách bylo smícháno 2,5 μl Tagment DNA pufru, 1,25 μl ATM mixu a 1,25 μl vzorku naředěného na koncentraci 0,5 ng/μl.
- 2) Obsah zkumavek byl promíchán pipetováním a krátce zcentrifugován.
- 3) Zkumavky byly umístěny do termocykléru MasterCycler Nexus (Eppendorf) a byl spuštěn program dle **Tabulky 16**.

Tabulka 16: Program pro tagmentaci

55 °C	5 min.
10 °C	∞

- 4) Do vzorků inkubovaných v termocykléru bylo přidáno 1,25 μl NT pufru. Po promíchání pipetováním byly vzorky krátce zcentrifugovány.
- 5) Vzorky byly inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě.

- 6) Do vzorků bylo přidáno 3,75 μ l NPM mixu, 1,25 μ l index primeru i5 a 1,25 μ l index primeru i7. Jejich kombinace musela být unikátní pro jeden běh. Přehled vložených i5 a i7 indexových primerů je vypsán v **Tabulce 17**.

Tabulka 17: Přehled jednotlivých indexových primerů i5 a i7 vložených do poolů

Číslo poolu	i5	i7
	Značení indexu	
1	6	1
2	6	2
3	6	3
4	6	4
5	7	1
6	7	2
7	7	3

- 7) Vzorky byly umístěny do termocykléru a byl spuštěn program dle **Tabulky 18**.

Tabulka 18: Program pro indexační PCR

Teplota [°C]	Čas	
72	3 min.	
95	30 s	
95	10 s	
55	30 s	16 cyklů
72	30 s	
72	5 min.	
10	∞	

- 8) Amplifikované knihovny byly přečištěny pomocí QIAquick Purification kitu (viz výše) a kvantifikovány pomocí Qubit dsDNA HS Assay kitu (viz výše).

- 9) Indexované knihovny byly ekvimolárně smíchány dle **Tabulky 19** do jediného poolu, ten byl kvantifikován pomocí Qubit dsDNA HS Assay kitu a uchován k budoucí sekvenaci.

Tabulka 19: Objemy z dílčích poolů, napipetované do jednoho ekvimolárního poolu.

Číslo poolu	Objem [μl]
1	2,27
2	3,00
3	2,46
4	2,87
5	2,21
6	2,03
7	1,72

5. Výsledky

5.1. Vyhodnocení testování primerů navržených v software BiSearch a PrimerSuite

Primery navržené v software PrimerSuite a BiSearch byly otestovány kvantitativní PCR reakcí specifickou pro detekci metylace. Testování primerových směsí, jmenovitě PM 688, 689, 690, 691, 692, 691 a 187, probíhalo s reagensiemi poskytnutými ÚMTM (viz **Tabulka 2**). PCR reakce byla uskutečněna v LightCycler® 480 II (Roche).

Experiment ukázal, že nedochází k amplifikaci metylované bisulfitové kontroly DNA pomocí navržených primerů, a tak byly primery z dalších experimentů vyřazeny.

5.2. Vyhodnocení testování primerů nalezených v literatuře a dalších navržených primerů

V rámci rešerše byly vyhledány primery specifické pro podrodiny Alu repetit. Byly vybrány primery podle Weisenbergera, 2005 a Erichsena, 2018. Dále byly vybrány již odzkoušené primery z databáze ÚMTM (PM 700, 701 a 702), které vykazovaly amplifikaci pro Alu podrodiny. Tyto primery jsou vypsány v **Tabulce 5 a 6**. Dále byly navržené další primery pro Alu podrodiny (viz **Tabulka 2**), tzn. PM 696, 697, 698 a 699.

Kromě PM 701 došlo k amplifikaci ve všech vzorcích. Kvůli vysokému Cp byly vyřazeny i PM 700 a 702.

5.3. Vyhodnocení kvantifikace izolované DNA pomocí Qubit dsDNA HS Assay kitu

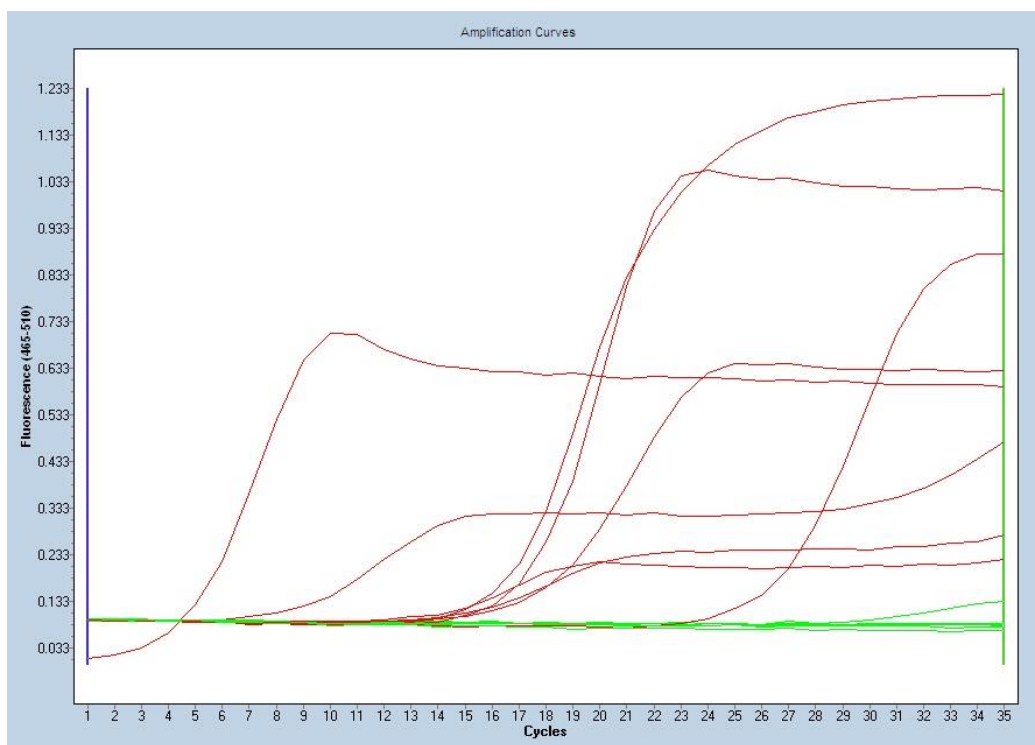
Izolovaná DNA dárců byla kvantifikována pomocí Qubit dsDNA HS Assay kitu. Koncentrace jednotlivých DNA jsou uvedeny v **Tabulce 20**.

Tabulka 20: naměřená koncentrace pomocí Qubit fluorometru v ng/μl

Mladí	c [ng/μl]	Staří	c [ng/μl]	Kontrolní DNA	c [ng/μl]
1	34,6	4	28,7	8	46,5
2	409	5	31,8		
3	46,5	6	5,97		
		7	23,1		

5.4. Vyhodnocení optimalizace primerů

Pokus ukázal, že primery z literatury vykazují amplifikaci DNA metylované bisulfitové kontroly (viz Obrázek 4).



Obrázek 4: Průběh PCR reakce pro optimalizaci primerů pro metylovanou bisulfitovanou DNA, PM 696, 697, 698, 699, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 189, 190, 400 a 401. Popis je uveden ve formě tabulky níže.

Jednotlivé PM byly vyhodnoceny dle Cp (bod křížení) do **Tabulky 21**.

Tabulka 21: Analýza primerů po qPCR experimentu optimalizace

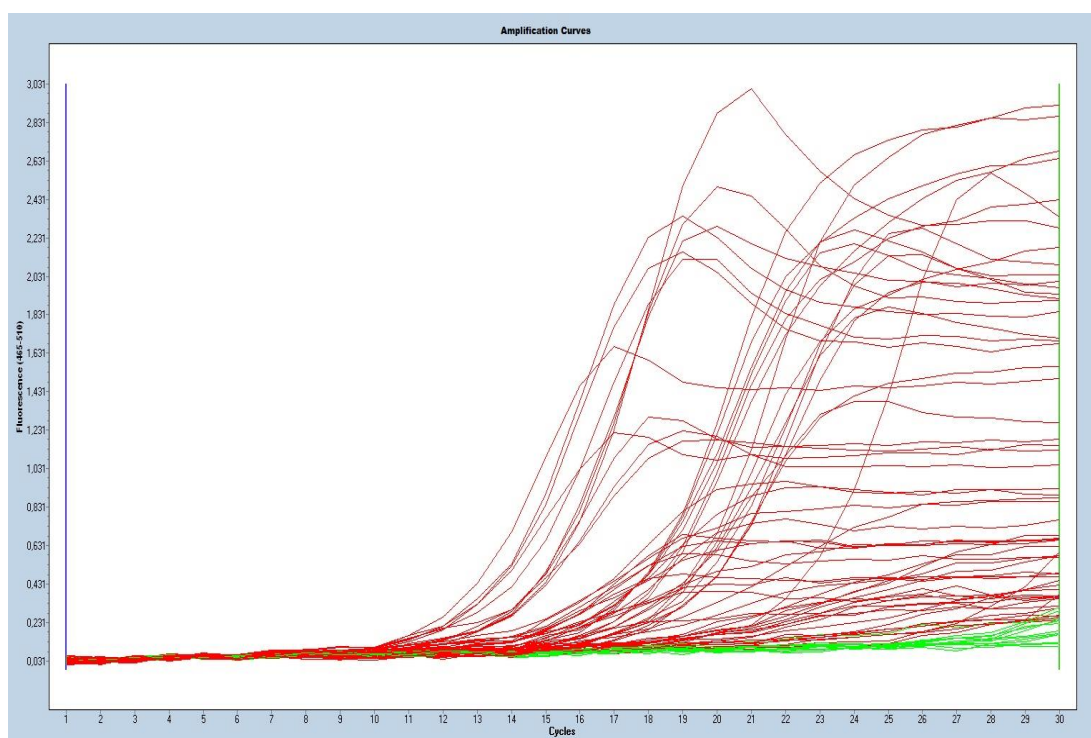
PM	Specificita	Cp	Pozn.
696	Alu bisulfite primers	-	Vyřazeno (nespolehlivé)
697	Alu bisulfite primers	-	
698	AluY bisulfite primers	-	
699	AluSc bisulfite primers	-	
703	AluM1 bisulfite primers	16,7	
704	AluM2 bisulfite primers	16,1	
705	AluM3 bisulfite primers	15,2	
706	AluU3 bisulfite primers	-	Křivka tání detekována
707	Alu bisulfite primers	5	
708	Alu bisulfite primers	9	
189	Alu M5	15,9	
190	Alu C4	31	
400	AluM5 methylated	15,4	
401	AluM5 unmethylated	25,4	

Softwarově navržené primery na rozdíl od primerů nalezených v literatuře nevykazovaly příznivou amplifikaci DNA metylované bisulfitové kontroly pro další experimenty, a tak byly vyřazeny.

Dále bylo analyzováno 10 primerových směsí složené z primerů nalezených v literatuře. Získané Cp hodnoty poskytují informaci o účinnosti amplifikace. Primerová směs 703 vykazovala hodnotu Cp 16,7, primerová směs 704 měla hodnotu Cp 16,1 a primerová směs 705 dosáhla hodnoty Cp 15,2. Tyto výsledky naznačují úspěšnou amplifikaci, přičemž nižší hodnota indikuje silnější signál amplifikace. Primerová směs 706 nevykazovala příznivé Cp, nicméně nebyla vyřazena z experimentu kvůli pozitivní analýze křivky tání. Naopak primerové směsi 707, 708 dosahovaly nízkých hodnot Cp (Cp = 5 a 9), což svědčí o silné amplifikaci cílových sekvencí. Primerové směsi 190 a 401 vykazovaly vyšší Cp, primerové směsi 189 a 400 vykazovaly úspěšnou amplifikaci DNA s Cp 15,9 a 15,4.

5.5. Vyhodnocení testování optimalizovaných primerů na bisulfitované DNA mladých a starých jedinců

Vzorky dárců (viz **Tabulka 1**) byly podrobeny bisulfitové konverzi pro změnu nemetylovaných cytosinů na uracil. Bylo vytvořeno 7 PCR master-mixů, každý z nich obsahoval jinou izolovanou DNA po bisulfitové konverzi. Na každé DNA bylo vyzkoušeno všech 10 optimalizovaných PM (viz **Tabulka 21**). Všech 70 vzniklých vzorků bylo nasazeno na kvantitativní PCR reakci, jejíž průběh je znázorněn na **Obrázku 5**.



Obrázek 5: Průběh qPCR reakce pro 7 vzorků DNA po bisulfitové reakci amplifikované primerovými směsmi PM 703, 704, 705, 706, 707, 708, 189, 190, 400 a 401

Amplifikaci vykazovala většina vzorků. Nulovou amplifikaci vykazovaly vzorky s přidanou primerovou směsí PM 189. Dále neproběhla amplifikace u vzorků 401-3, 401-4, 401-5, 401-7 a 706-5.

5.6. Vyhodnocení kvantifikace DNA a založení knihoven

Křivky PCR byly rozděleny dle jejich C_p a byl vybrán vždy jeden vzorek amplifikován daným PM s nejmenším C_p a s nejvyšším C_p . Byla změřena koncentrace těchto amplikonů pomocí Qubit dsDNA HS assay kitu, koncentrace viz **Tabulka 22**.

Tabulka 22: Fluorometricky naměřená koncentrace ampliconů DNA jednotlivých PM.

č. DNA-PM	Koncentrace [ng/μl]
6-703	0,71
3-703	0,28
1-704	1,78
7-704	-
6-705	0,28
2-705	1,23
1-706	0,60
2-706	14,92
1-707	11,12
4-707	0,95
1-708	0,85
7-708	-
189	-
3-190	0,55
4-190	0,91
1-400	18,70
5-400	9,63
1-401	12,10
6-401	0,83

Po ekvimolárním smíchání do 7 poolů byla opět fluorometricky změřena koncentrace pomocí Qubit dsDNA HS Assay kitu, viz **Tabulka 23**.

Tabulka 23: Koncentrace ekvimolárně smíchaných poolů ampliconů

Číslo poolu	Koncentrace [ng/μl]
1	0,69
2	2,63
3	1,92
4	1,64
5	1,03
6	1,98
7	0,82

Po tagmentaci a tvorbě knihoven byla naměřená koncentrace uvedena v **Tabulce 24**.

Tabulka 24: Naměřená koncentrace knihoven vytvořených z poolů ampliconů

Číslo knihovny	Koncentrace [ng/μl]
1	4,39
2	3,33
3	4,05
4	3,48
5	4,51
6	4,92
7	5,80

Ekvimolárně smíchaný pool z výše uvedených knihoven byl fluorometricky kvantifikován na 4,3 ng/μl. Tento pool bude v budoucnu sekvenován metodou masivně paralelního sekvenování (MPS).

Pro další postup v projektu (pro masivně paralelní sekvenování) se mi podařilo optimalizovat tyto primerové směsi: PM 703 pro podrodinu **Alu uM1**, PM 704 pro **Alu uM2**, PM 705 pro **Alu uM3**, PM 400 a 401 pro **Alu M5**, PM 190 pro **Alu C4**, PM 706 pro **Alu U3** a PM 707 a 708 pro **Alu** po bisulfitační reakci.

Naopak se mi nepodařilo amplifikovat podrodiny AluY pomocí PM 700, AluSc pomocí PM 701 a AluJb pomocí PM 702. Dále se nepodařilo pomocí navržených PM 688, 689, 690, 691, 692, 693, 696, 697, 698 a 699 amplifikovat podrodiny AluY, AluSc a AluJb a jejich konsenzuální sekvenci.

6. DISKUSE

Metylace DNA je jeden z nejdůležitějších epigenetických mechanismů, který reguluje expresi genu. Tento proces je esenciální v období vývoje plodu, kdy pomocí DNA metyltransferáz probíhá metylace a demethylace *de novo* a tím je umožněno buňkám, aby se diferencovaly do specifických tkání (Moore, Le, Fan, 2013). Metylace je soustředěna výhradně na cytosinových bázích v CpG dinukleotidech, které jsou sdruženy v CpG ostrůvky. Změny metylačního profilu jsou asociovány s různými chorobami – například při rakovinném bujení je typická hypomethylace genomu a hypermethylace specifických genů (Robertson, 2005).

Ve forenzních vědách můžeme z DNA získat epigenetický metylační profil, díky němuž může být určen přibližný věk zůstavitele stopy, a tím zúžit populaci podezřelých při hledání nebo identifikaci pachatele. Naše hypotéza se opírá o fakt, že Alu repetice se hojně v mnoha kopiích vyskytují napříč genomem. Z tohoto hlediska je možné předpokládat, že bude pro epigenetické vyšetření potřeba méně vstupní DNA.

V rámci experimentální části byly optimalizovány primerové směsi pro amplifikaci Alu podrodin a tím se provedly první kroky pro testování využití repetice jako zdroje epigenetického signálu pro určení věku. Mnou navržené primery pro Alu podrodiny AluSc, AluJb a AluY a jejich konsenzus nevykazovaly amplifikaci, zatímco již odzkoušené primery a primery z literatury (Weisenberger *et al.*, 2005; Erichsen *et al.*, 2018) amplifikovaly Alu repetice metylované bisulfitové DNA; konkrétně se podařilo amplifikovat Alu podrodiny Alu uM1, Alu uM2, Alu uM3, Alu M5, Alu C4, Alu U3.

Tento rozdíl v úspěšnosti amplifikace (mnou navržené vůči vyhledaným v literatuře) by mohl být způsoben několika faktory: navržené primery možná neměly dostatečnou specifitu pro amplifikaci cílů z bisulfitové DNA. Softwarový návrh primerů probíhal dle manuálů na Internetu a optimalizace PCR byla směřována ke kompatibilitě s pufrů pro primery z literatury. Je možné, že pro mnou navržené primery bude vhodnější jiný pufr, popřípadě jiná polymeráza. Primery z literatury již prošly optimalizací a validací, což může vysvětlovat jejich lepší efektivitu. Kromě specifity mohla v neúspěšné amplifikaci hrát roli kvalita a kvantita DNA. Bisulfitová konverze může mít za následek úbytek a degradaci konvertované DNA. Pokud výchozí kvalita nebo kvantita DNA nebyla dostatečná, mohlo to ovlivnit úspěšnost amplifikace

Alu repetice. Tato možnost je ale málo pravděpodobná, protože by se projevila jak u navržených, tak u vyhledaných primerů. Kromě těchto těchto faktorů mohla amplifikace selhat i z důvodu chyb lidského faktoru, ačkoliv byla práce prováděna dle daných pracovních postupů a za ideálních podmínek pro práci s DNA. Lidská chyba při pipetování by se však projevila systémově a ne jen u mnou navržených primerů.

Vysvětlením není, že se podrodiny AluSc, AluJb a AluY v genomu vyskytují v menší míře než úspěšně amplifikované podrodiny. AluY je nejmladší Alu podrodina, podléhá časté retrotranspozici a vyskytuje se v genomu v poměrně velké míře, stejně jako podrodina AluSc. AluJb jsou evolučně nejstarší a v genomu se vyskytují v nejmenší míře (Liu *et al.*, 2009), nicméně tyto repetice byly amplifikovány v rámci experimentu Yang *et al.*, 2004 za využití méně cyklů v PCR reakci.

Vysvětlením by mohl být technický problém, například rozpuštění mnou navržených primerů pro Alu repetice po syntéze a lyofilizaci ve špatném pufru (se špatným pH), který by ovlivnil jejich efektivitu. Tato hypotéza je testovatelná novou objednávkou primerů a jejich rozpuštěním ve vodě.

Možností optimalizace navržených primerů může být pokus revidovat návrh primerů po bisulfitační konverzi nebo optimalizovat podmínky PCR reakce, např. navýšením počtu cyklů.

Pro budoucí experimenty můžeme také zvážit, zda jsou i jiné repetice, které mohou být teoreticky vhodnější pro náš experiment. Kromě Alu repetice by mohly být použity LINE-1 elementy, které také podléhají metylaci a mohly by tak sloužit jako marker pro určení věku. Jejich analýzu, stejně jako pro Alu elementy, provedl Erichsen *et al.*, 2018 a objevil mezi LINE-1 elementy a věkem korelaci.

Úspěšná amplifikace primerů z literatury poukazuje na specifičnost vůči podrodinám Alu repetice; tyto amplikony dále poslouží jako vzorek pro masivně paralelní sekvenaci pro vypracování modelu pro určení věku dárců a pro potvrzení poznatků z článku Erichsen *et al.*, 2018.

Hypotéza, že je metylace spojená s věkem specifická pro určité podrodiny Alu nebo pro Alu repetice celkově bude odzkoušena metodou masivně paralelní sekvenace pro kvantifikaci metylačního stavu jednotlivých CpG míst v amplifikovaných Alu sekvencích. Následně budou metylační profily Alu sekvencí různých věkových skupin porovnány a analyzovány, zda existují významné statistické rozdíly v metylaci mezi různými podrodinami. Experiment dle Xie *et al.*, 2009 ukázal, že metylace některých podrodin Alu repetice je věkově specifická, což naznačuje, že metylace může být

selektivní pro určité Alu repetice (podrodiny) spíše než uniformní pro všechny Alu repetice.

V rámci experimentu jsme potvrdili, že je možné rozlišit Alu podrodiny pomocí PCR po bisulfitační reakci, přestože je návrh primerů pro DNA templát po bisulfitové reakci náročnější a jednotlivé Alu podrodiny se liší jen minimálně. Primery specificky navržené pro jednotlivé Alu podrodiny byly odzkoušeny na metylované DNA po bisulfitační reakci, která změnila nemetylované cytosiny na uracil.

Hypotézu, zda lze sekvenovat Alu podrodiny pomocí masivně paralelního sekvenování (MPS) zatím touto prací nelze potvrdit, ani vyvrátit, protože DNA bude sekvenována až v rámci budoucích experimentů.

7. ZÁVĚR

V rámci teoretické části této bakalářské práce byla vypracována literární rešerše o epigenetice a její roli v regulaci genové exprese. Další kapitoly byly zaměřeny na metylaci cytosinu, Alu repetice, biomarkery epigenetického určení věku a na metody analýzy metylace DNA pomocí PCR a sekvenace.

Experimentální část byla zaměřena na bisulfitovou konverzi, návrh PCR primerů pro Alu podrodiny po bisulfitové konverzi, vyhledání primerů v literatuře, jejich testování pomocí kvantitativní PCR reakce a nachystání vzorků pro přípravu tagmentačních knihoven a poolů pro budoucí experiment masivně paralelního sekvenování.

Po úspěšné automatizované izolaci DNA z krve dárců byla kvantifikovaná DNA podrobena úspěšné bisulfitové konverzi. Následoval návrh primerů pro Alu podrodiny AluSc, AluY, AluJb jednotlivě a pro jejich konsenzuální sekvenci. Žádný z těchto primerů nevykazoval amplifikaci metylované bisulfitové DNA dárce. Dále byly testovány primery vyhledané v literatuře a již odzkoušené primery z databáze ÚMTM, ty naopak vykazovaly příznivou amplifikaci Alu repetice u valné většiny metylovaných bisulfitovaných vzorků DNA dárců. Následně byly z amplikonů zhotovené pooly, podrobeny tagmentaci, kvantifikovány fluorometricky a byl vytvořen jeden jediný pool o koncentraci 4,3 ng/μl, který bude v rámci diplomové práce testován metodou masivně paralelního sekvenování.

Na základě výsledků můžeme usuzovat, že na základě kvantitativní PCR reakce náš experiment prokázal specifitu vůči Alu repeticím po bisulfitové konverzi, což nabízí předpoklad pro možnost testování metody stanovení věku ze vzorků krve (popřípadě jiné tkáně) zaměřeného právě na analýzu repetitivních Alu sekvencí.

8. LITERATURA

Ke korekci textu a úpravě stylistiky byl použit nástroj ChatGPT (GPT4).

AL ABOUD, Nora M.; TUPPER, Connor; JIALAL, Ishwarlal. Genetics, epigenetic mechanism. 2018.

ROBERTSON, Keith D. DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6.8: 597-610.

JIN, Bilian; LI, Yajun; ROBERTSON, Keith D. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy?, *Genes & cancer*, 2011, 2.6: 607-617.

KIM, J. K.; SAMARANAYAKE, Mala; PRADHAN, Sriharsa. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and molecular life sciences*, 2009, 66: 596-612..

FAZZARI, Melissa J.; GREALLY, John M. Introduction to epigenomics and epigenome-wide analysis. *Statistical Methods in Molecular Biology*, 2010, 243-265.

BESTOR, Timothy H. The DNA methyltransferases of mammals. *Human molecular genetics*, 2000, 9.16: 2395-2402.

LANATA, Cristina M.; CHUNG, Sharon A.; CRISWELL, Lindsey A. DNA methylation 101: what is important to know about DNA methylation and its role in SLE risk and disease heterogeneity. *Lupus science & medicine*, 2018, 5.1: e000285.

ZAPICO, Sara C.; UBELAKER, Douglas H. Relationship between mitochondrial DNA mutations and aging. Estimation of age-at-death. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 2016, 71.4: 445-450.

BORSKÝ, Pavel; Drahomíra HOLMANNOVÁ; Lenka BORSKÁ, *et al.* Biomarkery stárnutí – aktuální stav poznání. *Časopis lékařů českých.*, 2023. (162), 194-202.

WEISENBERGER, Daniel J., *et al.* Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic acids research*, 2005, 33.21: 6823-6836.

SLABÝ, Ondřej, *et al.* Molekulární medicína. 1. vydání. *Galén*, 2015. 598 s.

PATTERSON, Kate, *et al.* DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2011, 56: e3170.

CHAN, Kin, *et al.* Base damage within single-strand DNA underlies in vivo hypermutability induced by a ubiquitous environmental agent. *PLoS genetics*, 2012, 8.12: e1003149.

SEEMANOVÁ, Eva. Syndromy s projevy genomického imprintingu. *Časopis lékařů českých*, 2003, **142**(5), 264-269.

NOROOZI, Rezvan, et al. DNA methylation-based age clocks: From age prediction to age reversion. *Ageing Research Reviews*, 2021, 68: 101314.

FANG, Chen, et al. Age estimation using bloodstain miRNAs based on massive parallel sequencing and machine learning: A pilot study. *Forensic Science International: Genetics*, 2020, 47: 102300.

KRIŠTIĆ, Jasminka, et al. Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 2014, 69.7: 779-789.

MENNI, Cristina, et al. Circulating proteomic signatures of chronological age. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 2015, 70.7: 809-816.

LIAO, Xingyu, et al. Repetitive DNA sequence detection and its role in the human genome. *Communications Biology*, 2023, 6.1: 954.

DAUNAY, Antoine, et al. Evaluation of six blood-based age prediction models using DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Scientific reports*, 2019, 9.1: 8862.

NAUE, Jana, et al. Chronological age prediction based on DNA methylation: massive parallel sequencing and random forest regression. *Forensic science international: genetics*, 2017, 31: 19-28.

SCOURZIC, Laurianne; MOULY, Enguerran; BERNARD, Olivier A. TET proteins and the control of cytosine demethylation in cancer. *Genome medicine*, 2015, 7: 1-16.

MALDONADO, Edio, et al. Aging hallmarks and the role of oxidative stress. *Antioxidants*, 2023, 12.3: 651.

CHRISTENSEN, Brock C., et al. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS genetics*, 2009, 5.8: e1000602.

MILLER, Ryan H., et al. Tissue-specific DNA methylation variability and its potential clinical value. *Frontiers in Genetics*, 2023, 14: 1125967.

SONG, Fei, et al. Tissue specific differentially methylated regions (TDMR): Changes in DNA methylation during development. *Genomics*, 2009, 93.2: 130-139.

LARSEN, Peter A., et al. Warning SINEs: Alu elements, evolution of the human brain, and the spectrum of neurological disease. *Chromosome research*, 2018, 26: 93-111.

DEININGER, Prescott. Alu elements: know the SINES. *Genome biology*, 2011, 12: 1-12.

VARSHNEY, Dhaval, et al. SINE transcription by RNA polymerase III is suppressed by histone methylation but not by DNA methylation. *Nature communications*, 2015, 6.1: 6569.

KOTKOVÁ, Lucie; DRÁBEK, Jiří. Age-related changes in sperm DNA methylation and their forensic and clinical implications. *Epigenomics*, 2023, 15.21: 1157-1173.

LU, Weisi, et al. Telomeres—structure, function, and regulation. *Experimental cell research*, 2013, 319.2: 133-141.

WANG, Tong; LOO, Christian E.; KOHLI, Rahul M. Enzymatic approaches for profiling cytosine methylation and hydroxymethylation. *Molecular Metabolism*, 2022, 57: 101314.

SUN, Ruixia; ZHU, Ping. Advances in measuring DNA methylation. *Blood Science*, 2022, 4.01: 8-15.

ESPADA, J.; ESTELLER, M. Epigenetic control of nuclear architecture. *Cellular and molecular life sciences*, 2007, 64: 449-457.

MATTICK, John S., et al. RNA regulation of epigenetic processes. *Bioessays*, 2009, 31.1: 51-59.

HORVATH, Steve. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome biology*, 2013, 14: 1-20.

ERICHSEN, Lars, et al. Genome-wide hypomethylation of LINE-1 and Alu retroelements in cell-free DNA of blood is an epigenetic biomarker of human aging. *Saudi journal of biological sciences*, 2018, 25.6: 1220-1226.

HANCKS, Dustin C.; KAZAZIAN, Haig H. Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mobile DNA*, 2016, 7: 1-28.

ROBERTS, Richard J., et al. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic acids research*, 2003, 31.7: 1805-1812.

BAKSHI, Arundhati, et al. DNA methylation variation of human-specific Alu repeats. *Epigenetics*, 2016, 11.2: 163-17

GIACCONI, Robertina, et al. Nutritional factors modulating alu methylation in an Italian sample from the mark-age study including offspring of healthy nonagenarians. *Nutrients*, 2019, 11.12: 2986.

BEKAERT, Bram, et al. Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics*, 2015, 10.10: 922-930.

ZBIEĆ-PIEKARSKA, Renata, et al. Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 2015, 17: 173-179.

MOORE, Lisa D.; LE, Thuc; FAN, Guoping. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38.1: 23-38.

RANA, Ajay Kumar. Crime investigation through DNA methylation analysis: methods and applications in forensics. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 2018, 8.1: 7.

XIE, Hehuang, et al. High-throughput sequence-based epigenomic analysis of Alu repeats in human cerebellum. *Nucleic acids research*, 2009, 37.13: 4331-4340.

SALAMEH, Yasmeen; BEJAOUI, Yosra; EL HAJJ, Nady. DNA methylation biomarkers in aging and age-related diseases. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 480672.

HEIDEGGER, A., et al. Development and inter-laboratory validation of the VISAGE enhanced tool for age estimation from semen using quantitative DNA methylation analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 2022, 56: 102596.

LI, Si-Jia, et al. Cell-free DNA methylation patterns in aging and their association with inflamm-aging. *Epigenomics*, 2024, 1-17.

LIU, George E., et al. Comparative analysis of Alu repeats in primate genomes. *Genome research*, 2009, 19.5: 876-885.

YANG, Allen S., et al. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic acids research*, 2004, 32.3: e38-e38.

GIBNEY, E. R.; NOLAN, C. M. Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 2010, 105.1: 4-13.

SEZNAM ZKRATEK

A3A	apolipoprotein B enzym upravující mRNA
ADAR	adenosin deamináza působící na RNA
AGE	konečné produkty pokročilé glykace
ATP	adenosintrifosfát
Bp	páry bází
CHRDL	protein podobný chordinu
CpA	cytosin-fosfát-adenin
CpC	cytosin-fosfát-cytosin
CpG	cytosin-fosfát-guanin
CpT	cytosin-fosfát-thymin
DDR	odpověď buněk na poškození DNA
dNTPs	deoxynukleosid trifosfáty
DNMTs	DNA metyltransferázy
EAA	akcelerace epigenetického věku
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
GDF15	protein zapojený do regulace růstu a diferenciaci (Growth Differentiation Factor 15)
GP1-24	označení peaků
H2AX	histon
H3K9	histon H3 na lyzinu 9
HAT	histonová acetyltransferáza
HDAC	histonová deacetyláza
IgG	imunoglobulin G
LINE	dlouhé rozptýlené jaderné elementy, typ transpozonu
LF UP	Lékařská fakulta Univerzity Palackého
LTRs	dlouhé terminální repetice
MAD	medián absolutních odchylek
m5C	5-metylcytosin
mRNA	messenger RNA
MDB	doména proteinů vázajících se na metylované CpG sekvence

MDB-seq	sekvenační metoda pro detekci metylovaných CpG míst
MeDIP	imunoprecipitace metylované DNA
MeDIP-seq	sekvenační metoda pro analýzu metylované DNA pomocí MeDIP
MITEs	malé transpozony s obráceným opakováním
MPS	masivně paralelní sekvenace
mt-DNA	mitochondriální DNA
MREs	restrikční enzymy citlivé na metylaci
MRE-seq	sekvenační metoda využívající enzymy citlivé na metylaci
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADP	nikotinamidadenindinukleotid fosfát
PCR	polymerázová řetězová reakce
PM	primerová směs
p53	tumor supresorový protein
PTN	pleitropin
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
rRNA	ribozomální RNA
SAM	S-adenosylmetionin
SASP	fenotyp spojený se sekrecí proteinů během buněčného stárnutí
scM&T	metoda pro analýzu metylomu a transkriptomu na úrovni jedné buňky
scRRBS	sekvenační metoda pro analýzu metylace DNA na úrovni jedné buňky
SCRAM	jednobuněčná restrikční analýza metylace
SINEs	krátké rozptýlené jaderné elementy
ssDNA	jednořetězcová DNA
SUV39	histonová metyltransferáza
T4-βGT	T4-fág β glukosyltransferáza
TAPS	TET-asistovaná pyridin boranová sekvenace
TDMR	tkáňově specifické metylované regiony
TeSLA	metoda pro měření nejkratší délky telomer
TET	ten-eleven translokační enzym
tRNA	transportní RNA

TP53	gen kódující tumor supresorový protein p53
TRF	terminální restrikční fragment
ÚMTM	Ústav molekulární a translační medicíny
UPLC	ultra výkonná kapalinová chromatografie
WGBS	celogenomová bisulfitační sekvenace
5caC	5-karboxylcytosin
5fC	5-formylcytosin
5hmC	5-hydroxymethylcytosin

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 4: Konverze cytosinu na 5-methylcytosin DNA metyltransferázou (DNMT), která katalyzuje přenos metyl skupiny (CH_3) z S-adenosylmethioninu (SAM) na pozici 5. uhlíku (Převzato a upraveno z Gibney *et Nolan*, 2010)

Obrázek 2: UPLC analýza imunoglobulinu IgG a jeho glykosylace. (Převzato z Krištić *et al.*, 2014)

Obrázek 3: Průběh bisulfitové konverze nemetylovaného cytosinu na uracil. (Převzato a upraveno z Patterson *et al.*, 2011)

Obrázek 4: Průběh PCR reakce pro optimalizaci primerů pro metylovanou bisulfitovanou DNA, PM 696, 697, 698, 699, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 189, 190, 400 a 401.

Obrázek 5: Průběh qPCR reakce pro 7 vzorků DNA po bisulfitové reakci amplifikované primerovými směsmi PM 703, 704, 705, 706, 707, 708, 189, 190, 400 a 401

10. SEZNAM TABULEK

Tabulka 4: Seznam poskytnutých vzorků DNA, jejich značení a věk dárců

Tabulka 5: Obsah PCR master-mixu pro testování navržených PM

Tabulka 6: PCR protokol pro testování navržených primerů.

Tabulka 7: sekvence navržených PCR primerů specifických pro Alu repeticce po bisulfitační reakci v software BiSearch a PrimerSuite

Tabulka 8: Seznam primerů specifických pro Alu podrodiny vyhledané v literatuře a již odzkoušené primery

Tabulka 9: Seznam primerů specifických pro Alu podrodiny vyhledané v literatuře a již odzkoušené primery – pokračování

Tabulka 7: Obsah PCR master-mixu pro testování primerů z literatury a úspěšných primerů

Tabulka 8: PCR protokol pro testování úspěšných PM a primerů z literatury

Tabulka 9: Protokol termocykléru pro bisulfitovou reakci

Tabulka 10: Obsah PCR master-mixu pro optimalizaci primerů

Tabulka 11: PCR protokol pro optimalizaci primerů

Tabulka 12: Obsah PCR master-mixu pro 10 reakcí

Tabulka 13: Protokol qPCR reakce pro amplifikaci dárcovské bisulfitované DNA pomocí optimalizovaných primerů

Tabulka 14: ekvimolární smíchání poolů: objemy jednotlivých PM příslušné DNA přidaných do poolů.

Tabulka 15: Schéma naředění poolů na koncentraci 0,5 ng/ μ l

Tabulka 16: Program pro tagmentaci

Tabulka 17: Přehled jednotlivých indexových primerů i5 a i7 vložených do poolů

Tabulka 18: Program pro indexační PCR

Tabulka 19: Objemy z poolů napipetované do jednoho ekvimolárního poolu

Tabulka 20: naměřená koncentrace pomocí Qubit fluorometru v ng/μl

Tabulka 21: Analýza primerů po qPCR experimentu optimalizace

Tabulka 22: Fluorometricky naměřená koncentrace amplikonů DNA jednotlivých PM.

Tabulka 23: Koncentrace ekvimolárně smíchaných poolů amplikonů

Tabulka 24: Naměřená koncentrace knihoven vytvořených z poolů amplikonů

11. Přílohy

Příloha 1: sekvence navržených primerů v software BiSearch a PrimerSuite

Tabulka 10: sekvence navržených PCR primerů specifických pro Alu repetice po bisulfitační reakci v software BiSearch a PrimerSuite

Primer mix (PM)	Směr	Primers	Délka
688	F	GTTTGTAATTTTAGTATTTTGGG	23
	R	CTTTTTTTTTAAAAATCTTCTC	22
689	F	GTAATTTTAGTATTTTGGGAGGT	23
	R	CTTTTTTTTTAAAAATCTTCTC	22
690	F	GTTTGTAATTTTAGTATTTTGGGAG	25
	R	CTTTTTTTTTAAAAATCTTCTC	22
691	F	AATTTTAGTATTTTGGGAGGTYG	23
	R	CTTTTTTTTTAAAAATCTTCTC	22
692	F	TTGTAATTTTAGTATTTTGGGAGG	24
	R	CTTTTTTTTTAAAAATCTTCTC	22
693	F	GGTGGTTTAYGTTTGTAATTTTAGTATTTG	31
	R	CTTTTTTTTTAAAAATCTTCTC	22
696	F	TAGTATTTTGGGAGGTTGAG	20
	R	ACAAACACCTACTACCACAC	20
697	F	TTTATTAAAAATATAAAAATTAGTTGGG	28
	R	CTCCCAAATACTAAAATTACAAAC	25
698	F	AAAAATATAAAAAATTAGTYGGG	23
	R	CCCAAATAAAAATACAATAAC	21
699	F	AAAATATAAAAAATTAGTTGG	20
	R	CTCCRAATAACTAAAATAAAA	24

Příloha 2: seznam primerů nalezených v literatuře a již odzkoušených primerů

Tabulka 11: Seznam primerů specifických pro Alu podrodiny, vyhledaných v literatuře a již optimalizované primery

Primer Mix	Směr	Primers	Délka	Specificita	Zdroj	
700	F	AACGTAATAACGAACGCCTA	20	AluY bis.	Odzkoušené fastPCR	
	R	AAATACAATAACGCGATCTCGAC	23			
701	F	AATAAACCGAAATCGCGCCA	20	AluSc bis.		
	R	CGAAATCTCGCTCTATCGCCA	21			
702	F	ACAACATAACGAAACCCCGTC	21	AluJb bis.		
	R	TCACTACAACCTCGACCTCC	20			
703	F	ATTATGTTAGTTAGGATGGTTTCGATTTT	29	Alu uM1 bis.		Weisenberger, 2005
	R	CAATCGACCGAACGCGA	17			
704	F	GCGCGGTGGTTTACGTTT	18	Alu uM2 bis.		
	R	AACCGAACTAATCTCGAACTCCTAAC	26			
705	F	ATTAGTCGGGCGTGGTGG	18	Alu uM3 bis.		
	R	CCCGAATTCAAACGATTCTCC	21			
706	F	TGGTTAATATGGTGAAATTTTGTTTTTATT	30	AluU3 bis.		
	R	TCCTACCTCAACCTCCCAAATAACT	25			
707	F	ATTTTAGTATTTTGGGAGGTCGAGGC	26	Alu po bis.	Erichsen, 2018	
	R	GCAATCTCGACTCACTACAAACTCCG	26			
708	F	GGGTGGATTATGAGGTTAGGAGAT	24	Alu po bis.		
	R	CATTCTCCTACCTCAACCTCCC	22			

Tabulka 12: Seznam primerů specifických pro Alu podrodiny vyhledané v literatuře a již optimalizované primery – pokračování

Primer Mix	Směr	Primers	Délka	Specificita	Zdroj
189	F	GGTATGATGGCGTATGTTTGT	21	Alu M5	Weisenberger, 2005
	R	GACTCACCACAACCTCCAC	19		
190	F	GGTTAGGTATAGTGGTTTATATTTGTAATTTTAGT A	36	Alu C4	
	R	ATTAATAAACTAATCTTAAACTCCTAACCTCA	33		
400	F	AGATCGAGATTATTTGCGTTAAAAC	25	Alu M5 meth.	Odzkoušené
	R	TCCCAAATAACTAAAAATACAAACG	25		
401	F	ATTGAGATTATTTTGGTTAAAATGG	25	Alu M5 unmeth.	
	R	CCAAATAACTAAAAATACAAACACC	25		