

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Rozlišení monozygotních dvojčat na epigenetické úrovni

Diplomová práce

Bc. Kristýna Michalcová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: doc. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně pod odborným vedením doc. Mgr. Jiřího Drábka, Ph.D. a s použitím uvedených zdrojů.

V Olomouci, 28. 4. 2017

.....

Kristýna Michalcová

Souhrn

Předložená diplomová práce se zabývá tématem dvojčat a možnostmi rozlišení monozygotních dvojčat.

V současné době je k identifikaci osob používáno DNA profilování, které je založeno na testování souboru krátkých tandemových repetitiv (short tandem repeats, STRs). Pomocí těchto genetických markerů však není možné navzájem rozlišit monozygotní (MZ) dvojčata. Možným řešením je využití celogenomového sekvenování k detekci vzácných jednobodových polymorfismů (single nucleotide polymorphisms, SNPs), které se nacházejí v genomu pouze jednoho sourozence. Tato metoda je však časově, finančně i technicky velmi náročná. Slibným řešením rozlišení MZ dvojčat se zdá být využití epigenetických markerů, konkrétně methylace DNA. Methylace DNA hraje důležitou roli v regulaci genové exprese, je ovlivňována působením vnějšího okolí a přispívá ke vzniku fenotypových rozdílů mezi MZ dvojčaty. Možným způsobem rozlišení MZ dvojčat je také využití biometrických metod.

V rámci praktické části předložené práce byl sledován epigenetický stav jednoho páru monozygotních dvojčat pomocí methylačně specifické vysokorozlišovací analýzy křivek tání (methylation-sensitive high resolution melting, MS-HRM).

Summary

This master thesis is concerned with the twins and with the possibilities of distinguishing monozygotic twins.

Today, human identification is carried out by testing a set of short tandem repeats (STRs). However, monozygotic (MZ) twins cannot be distinguished based on these genetic markers. It is possible to use whole genome sequencing for detection of rare single nucleotide polymorphisms (SNPs), which occur in genome of only one twin. However, this method is time-consuming, expensive and labour-intensive. A promising solution to this problem is analysis based on epigenetic markers such as DNA methylation. DNA methylation plays an important role in regulating gene expression, is influenced by environmental conditions and contributes to phenotypic discordances between MZ twins. MZ twins can also be distinguished based on biometric characteristics.

The experimental part of this thesis was designed to evaluate epigenetic state of one pair of monozygotic twins by using methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM).

Ráda bych poděkovala doc. Mgr. Jiřímu Drábkovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce a za cenné rady, které mi dával během provádění experimentální části i při písemném zpracování celé práce. Můj velký dík patří také sestřím Martině a Veronice Šedovým za jejich vstřícnost a trpělivost, se kterou mi poskytovaly vzorky bukálních stěrů.

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíle práce	9
3	Současný stav řešené problematiky	10
3.1	Dvojčata	10
3.1.1	Monozygotní dvojčata	11
3.1.2	Dizygotní dvojčata	13
3.1.3	Určení zygotnosti dvojčat	14
3.1.4	Monozygotní dvojčata ve forenzních případech	15
3.1.5	Možnosti rozlišení monozygotních dvojčat	16
3.1.5.1	Biometrie	16
3.1.5.2	Celogenomové sekvenování	17
3.1.5.3	Epigenetické markery	18
3.2	Epigenetické rozlišení MZ dvojčat	18
3.2.1	Methylace DNA	18
3.2.2	Bisulfitační konverze DNA	19
3.2.3	Zkoumané oblasti genomu	20
3.2.3.1	LINE elementy	21
3.2.3.2	SINE elementy	22
3.2.4	Metody použité k epigenetickému rozlišení MZ dvojčat	22
3.2.4.1	Bisulfitové pyrosekvenování	22
3.2.4.2	MS-HRM	23
4	Materiál a metodika	24
4.1	Přístroje	24
4.2	Programy a software	24
4.3	Pomůcky	24
4.4	Spotřební materiál	24
4.5	Chemikálie a roztoky	25
4.6	Biologický materiál	25
4.6.1	Odběr vzorků	25
4.6.2	Izolace DNA	26
4.6.3	Test monozygotnosti dvojčat	26
4.7	Detekce methylace pomocí MS-HRM	27
4.7.1	Bisulfitační konverze DNA	27
4.7.2	Primery pro PCR amplifikaci	27
4.7.3	Příprava PCR reakční směsi	28
4.7.4	Nastavení PCR programu	28

5	Výsledky	30
5.1	Ověření monozygotnosti dvojčat	30
5.2	Detekce methylace pomocí MS-HRM	30
5.2.1	MS-HRM u standardů DNA	31
5.2.2	MS-HRM u vzorků z bukálních stěrů	35
6	Diskuze	39
7	Závěr	42
8	Použitá literatura	43
9	Seznam použitých zkratk	50

1 Úvod

Monozygotní (MZ) neboli jednovaječná dvojčata vznikají rozdělením jednoho oplozeného vajíčka (zygoty), a proto jsou geneticky téměř identická. Pro forenzní genetiku, která se zabývá určováním totožnosti osob a zjišťováním příbuzenských vztahů, však genetická shoda MZ dvojčat představuje problém. Současná forenzně genetická analýza spočívá v testování souboru 16 – 24 krátkých tandemových repetitiv (short tandem repeats, STRs) (Butler, 2007) a jejím výsledkem je DNA profil unikátní pro každého člověka, ovšem s výjimkou MZ dvojčat. Ke genetickému rozlišení MZ dvojčat je potřeba využít sofistikovanější metodu, jakou se ukázalo být celogenomové sekvenování. Bylo prokázáno, že díky celogenomovému sekvenování je možné detekovat vzácné mutace nacházející se v jaderném genomu (Weber-Lehmann *et al.*, 2014) nebo mitochondriálním genomu (Wang *et al.*, 2015) pouze u jednoho ze sourozenců. K zavedení celogenomového sekvenování do běžné praxe je však tato metoda příliš finančně, časově a technicky náročná.

Finančně, časově i technicky méně náročné by však mohlo být využití znalostí o úpravách DNA, které se podílejí na ovlivnění exprese genetické informace, ale bez zásahu do její nukleotidové sekvence. Jedná se o takzvané epigenetické změny, konkrétně o metylaci pátého atomu uhlíku cytosinu. Výsledkem takovéto analýzy je methylomový profil, pro jehož spolehlivé uvedení do praxe je však ještě nutné zjistit a ověřit, které úseky genomu se u MZ dvojčat dostatečně liší stupněm methylace a zároveň vykazují stabilitu methylace v čase.

Díky fenotypovým rozdílům je možné MZ dvojčata spolehlivě rozlišit také pomocí biometrických rysů, jako jsou otisky prstů (Jain *et al.*, 2002) a dlaní (Kong *et al.*, 2006) nebo struktury oka (Hollingsworth *et al.*, 2010).

2 Cíle práce

Cílem teoretické části práce bylo sepsání rešerše zaměřené na téma dvojčat, na rozdíly mezi jednovaječnými a dvojevaječnými dvojčaty, na dosavadní genetické a negenetické metody rozlišení jednovaječných dvojčat od sebe navzájem a na možnosti rozlišit je pomocí epigenetické metody – detekcí methylace cytosinů.

Cílem praktické části práce bylo naplánovat a provést časosběrný pokus sledování epigenetického stavu jednoho páru monozygotních dvojčat a zodpovědět otázku, nakolik je methylomový profil vhodný k identifikaci jednotlivého dvojčete, tedy nakolik je methylomový profil ve dvojčecím páru odlišný a stabilní.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Dvojčata

Asi 2 – 3 % novorozenců přichází na svět porodem vícečetného těhotenství (Euro-Peristat, 2013; Martin *et al.*, 2017). V naprosté většině se jedná o těhotenství dvojčetná, která končí porodem dvojčat. Dvojčata mohou být buď jednovaječná (monozygotní, MZ) nebo dvojevaječná (dizygotní, DZ).

Zhruba jednu třetinu dvojčat představují MZ dvojčata. Protože vznikají splynutím jednoho vajíčka s jednou spermií, mají stejnou genetickou výbavu, stejné pohlaví a fyzicky jsou si vzájemně velmi podobná (Hall, 2003). Vznik MZ dvojčat je spíše náhodným procesem, a tak je jejich výskyt na celém světě vcelku rovnoměrný.

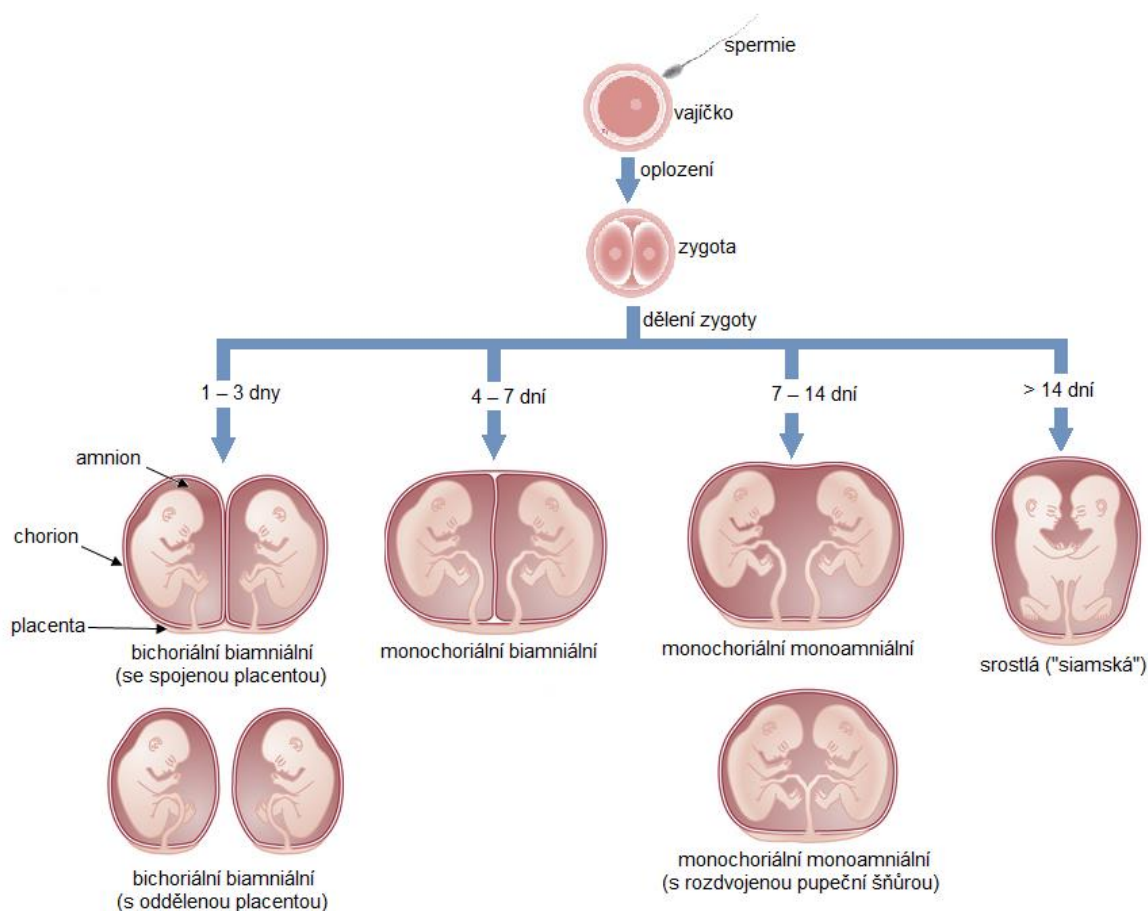
Zbýlé dvě třetiny dvojčat potom tvoří DZ dvojčata. Ta vznikají splynutím dvou vajíček se dvěma spermii, a proto jsou si geneticky podobná ve stejném rozsahu jako sourozenci z jednočetných těhotenství. Mohou mít stejné, ale i rozdílné pohlaví a fyzicky se podobají mnohem méně než MZ dvojčata (Hall, 2003). Vznik DZ dvojčat bývá však ovlivněn několika faktory, jako je etnický původ, věk a genetická výbava matky nebo počet těhotenství, která matka prodělala (Hankins *et Saade*, 2005). Nejméně dvojčetných těhotenství bylo zaznamenáno u asijské populace (6 dvojčetných těhotenství z 1000 těhotenství), potom u populace z USA a Evropy (10 – 20 z 1000) a nejvíce u populace africké (40 z 1000) (Hall, 2003). Dalším faktorem je biologický věk matky. Vznik DZ dvojčat je častější u žen nad 36 let, protože v jejich těle přirozeně dochází ke změnám v hladinách hormonů ovlivňujících proces otěhotnění. Jedná se hlavně o vyšší hladinu folikulostimulačního hormonu (FSH), která způsobuje častější uvolňování dvou a více vajíček během ovulace (Beemsterboer *et al.*, 2006; Hoekstra *et al.*, 2008; Derom *et al.*, 2011). Dalším faktorem je počet těhotenství, která matka prodělala. U žen, které v minulosti otěhotněly alespoň čtyřikrát, byl zaznamenaný výskyt dvojčetného těhotenství asi o 1 – 5 % vyšší (Hankins *et Saade*, 2005). Velmi významným faktorem jsou genetické předpoklady matky. V lidské populaci totiž existují sekvenční varianty dvou genů – genu pro beta podjednotku FSH (gen *FSHB*) a genu pro protein přenášející extracelulární signály (gen *SMAD3*). Určité varianty *FSHB* a *SMAD3* pak mají různý vliv na produkci FSH nebo proteinů signálních drah zapojených v procesu dozrávání oocytů, a tím ovlivňují pravděpodobnost početí DZ dvojčat (Mbarek *et al.*, 2016).

V souvislosti se vznikem a výskytem dvojčat je diskutovaným tématem využívání metod asistované reprodukce (*assisted reproductive technology, ART*). Při problémech s početím je možné zvýšit šanci na otěhotnění umělou hormonální stimulací ovulace, a to pomocí FSH a luteinizačního hormonu (LH). V případě neplodnosti partnerů ale samotná hormonální stimulace nestačí a přistupuje se k technice mimotělního oplodnění (*in vitro fertilisation, IVF*), kdy je do dělohy ženy přeneseno již vzniklé embryo (*embryotransfer, ET*). Embryo se připravuje buď kultivací vajíčků v roztoku se spermii nebo vpravením jedné spermie přímo do cytoplazmy zralého vajíčka (*intracytoplasmic sperm injection, ICSI*). Oplozená vajíčka jsou kultivována 2 – 3 nebo 5 – 6 dní na speciálním médiu a poté je k přenosu do dělohy použito jedno embryo (*single-embryo transfer, SET*), dvě (*double-embryo transfer, DET*) nebo více z nich (*multiple-embryo transfer, MET*). Bylo zaznamenáno, že technika SET a ICSI obecně zvyšuje pravděpodobnost vzniku MZ dvojčat oproti přirozenému počtu nejméně dvakrát (Vitthala *et al.*, 2009), ale záleží na samotném provedení techniky, podmínkách kultivace embryí nebo vývojovém stádiu přenášeného embrya (Vitthala *et al.*, 2009; Kanter *et al.*, 2015). Využití techniky DET, často v kombinaci s hormonální stimulací, zase zvyšuje pravděpodobnost vzniku DZ dvojčat a až třetina všech těhotenství po využití ART končí porodem DZ dvojčat (Joy *et al.*, 2008; Groeneveld *et al.*, 2012).

3.1.1 Monozygotní dvojčata

Monozygotní dvojčata vznikají splynutím jednoho vajíčka s jednou spermii a následným rozdělením oplozeného vajíčka (zygoty) na dva vyvíjecí se zárodky (viz obrázek č. 1). V závislosti na době uplynulé od oplození, kdy rozdělení zygoty nastane, se kolem embryí vytváří příslušný počet vnějších a vnitřních zárodečných obalů (chorionů a amnionů), které určují chorionicitu a amnionicitu dvojčat (Hall, 2003). Asi ve třetině případů dochází k rozdělení mezi prvním a třetím dnem od oplození. Každé z dvojčat pak má vlastní chorion i amnion, a proto jsou označovány jako bichoriální biamniální. Nejčastěji k rozdělení dochází mezi čtvrtým a sedmým dnem. Dvojčata pak sdílejí jeden chorion, ale každé má vlastní amnion, a jsou tedy monochoriální biamniální. Vzácně (asi v 1 % případů) rozdělení nastane mezi sedmým a čtrnáctým dnem. Dvojčata pak sdílejí jak chorion, tak amnion, a jsou označovány jako monochoriální monoamniální. V extrémně vzácných případech může k rozdělení zygoty dojít i po čtrnáctém dni od oplození, což má za následek vznik srostlých („siamských“) dvojčat, která jsou vždy monochoriální monoamniální (Hall, 2003).

Obrázek č. 1 – Embryogeneze monozygotních dvojčat. Upraveno podle Greaves *et al.*, 2003; obrázky převzaty z Tarsa *et Moore*, 2015.



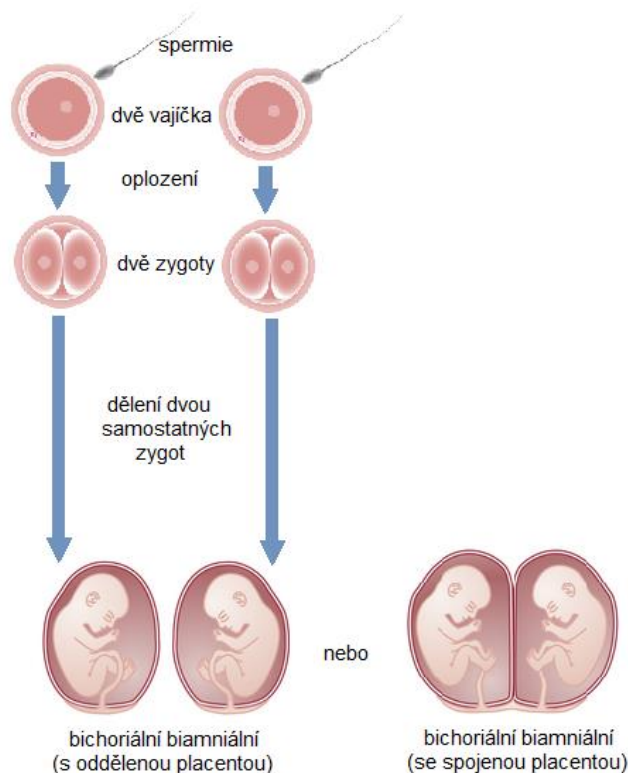
Chorionicita určuje, kolika placentami budou embrya vyživována. Monochoriální dvojčata vždy sdílejí jednu placentu a bichoriální dvojčata mají každé svou placentu, ačkoliv placenty bichoriálních dvojčat někdy mohou splynout v jednu (Hall, 2003) (viz obrázek č. 1). Od chorionicity se také odvíjí, jak bude probíhat krevní zásobení embryí placentou. Zatímco bichoriální dvojčata mají zcela oddělené placentární krevní oběhy, u monochoriálních je v 95 % případů tento oběh společný. U monochoriálních dvojčat totiž v placentě dochází ke vzniku takzvaných anastozómů, což jsou cévní spojení mezi oběhy obou dvojčat (Lewi *et al.*, 2007). Co se výživy plodů dále týče, má většina MZ dvojčat vlastní pupeční šňůru. U monoamniálních dvojčat se však vzácně může vyvinout pouze jedna pupeční šňůra, která je rozdvojená, a vyživuje tak oba plody (Frisch *et al.*, 2011) (viz obrázek č. 1).

Určení chorionicity a amnionicity má velký význam v prenatalní diagnostice, protože čím více struktur mají dvojčata společných, tím vyšší je riziko vzniku komplikací během těhotenství. U dvojčat se společnou placentou může například docházet k nerovnoměrnému sdílení placentárního krevního oběhu, což má za následek větší krevní zásobení jednoho embrya na úkor druhého. Děje se tak například u syndromu fetu-fetální transfúze (*twin-to-twin transfusion syndrome*, TTS) nebo sekvence anémie-polycytémie (*twin anemia-polycythemia sequence*, TAPS) (Lewi *et al.*, 2003). Včasným určením možného rizika může být naplánovaná adekvátní léčba (například fetoskopická laserová koagulace cévních spojení nebo fetální transfúze krve), která zabraňuje poškození či úmrtí jednoho nebo obou plodů (Khalek *et al.*, 2013; Baschat *et Oepkes*, 2014). Nejlépe se chorionicita i amnionicita určují v prvním trimestru těhotenství pomocí ultrazvukového vyšetření, kdy je možné od sebe dobře rozeznat vnější a vnitřní obaly embryí (Devlieger *et al.*, 2001; Blumenfeld *et al.*, 2014).

3.1.2 Dizygotní dvojčata

Dizygotní dvojčata vznikají oplozením dvou vajíček, každého jednou spermií. Obě oplozená vajíčka se vyvíjejí zvlášť, a DZ dvojčata jsou tak vždy bichoriální biamniální (viz obrázek č. 2). Každé z dvojčat pak má buď vlastní placentu se samostatným placentárním krevním oběhem nebo sdílejí jednu zfúzovanou placentu s jedním krevním oběhem, podobně jako je tomu u bichoriálních MZ dvojčat (Hall, 2003). DZ dvojčata mohou výjimečně vzniknout i takzvanou heteropaternální superfekundací, což je případ, kdy je každé vajíčko oplozeno spermií jiného muže. K heteropaternální superfekundaci může dojít, když má žena pohlavní styk se dvěma muži během intervalu jedné ovulace. Každé z dvojčat pak má jiného biologického otce (Lu *et al.*, 1994; Hansen *et Simonsen*, 2008).

Obrázek č. 2 – Embryogeneze dizygotních dvojčat. Upraveno podle Greaves *et al.*, 2003; obrázky převzaty z Tarsa *et Moore*, 2015.



3.1.3 Určení zygotnosti dvojčat

V případě dvojčetného těhotenství je určení zygotnosti důležitým údajem, protože pomáhá stanovit riziko vzniku možných komplikací, které mohou nastat jak během těhotenství, tak i po něm. Obecně je rizikovější těhotenství s MZ dvojčaty. V prenatalním období je možné zygotnost odhadnout pomocí ultrazvukového vyšetření už v prvním trimestru těhotenství, a to stanovením chorionicity a amnionicity dvojčat (Devlinger *et al.*, 2001). Problémem je, že jen díky chorionicitě a amnionicitě od sebe nelze rozlišit bichoriální MZ a bichoriální DZ dvojčata (Hall, 2003). Fyzická charakteristika placenty je tak často doplňována biochemickou a genetickou analýzou. Biochemické testování spočívá v určování typů krevních skupin, polymorfismů u sérových enzymů nebo stanovení typů lidských leukocytárních antigenů (*human leukocyte antigen*, HLA). Podle toho, do jaké míry se tyto charakteristiky mezi dvojčaty shodují, lze určit, o který typ zygotnosti se jedná. K velmi spolehlivému určení zygotnosti dvojčat patří genetická analýza, takzvané profilování DNA (Yang *et al.*, 2006). Profilování DNA spočívá ve vyšetření polymorfismů u vybraného souboru 16 – 24 krátkých tandemových repetitivních sekvencí (*short tandem repeats*, STRs) ve vzorku DNA (Butler, 2007). K testování je vhodné odebrat vzorek DNA nejlépe z nehematopoetické

tkáně, jako je například buklí stěr nebo tkáň z pupeční šňůry. Výsledkem profilování DNA je genetický profil, který je až na MZ dvojčata pro každého člověka unikátní. Shodné DNA profily tak znamenají potvrzení monozygotnosti dvojčat (Yang *et al.*, 2006). K určení zygotnosti je možné STR analýzu doplnit i testováním souboru bodových polymorfismů (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) (Hannelius *et al.*, 2007).

3.1.4 Monozygotní dvojčata ve forenzních případech

V roce 2007 byl ve státě Missouri (USA) řešen případ MZ dvojčat nařčených z otcovství. Jednalo se o bratry Raymona a Richarda Millerovi, kteří ve stejném časovém období udržovali sexuální vztah s jednou ženou. Žena posléze otěhotněla a za otce svého dítěte označila Raymona Millera. Když však vyšla najevo pravda o jejím vztahu také s druhým bratrem, nechtěl ani jeden z mužů přijmout odpovědnost za rodičovství. Žena proto požádala o provedení testu otcovství. Výsledek testu byl ale k potvrzení nebo vyvrácení otcovství nevhodný, protože oba muži měli stejný profil DNA. Jelikož v tomto případě neexistovaly kromě vzorků DNA žádné jiné důkazy a žena uvedla jako biologického otce Raymona Millera, soud rozhodl, že Raymon biologickým otcem zůstane a bude plnit povinnost placení výživného (FindLaw, 2017). Jestli bylo rozhodnuto správně, není dodnes známo.

V roce 2012 a na začátku roku 2013 došlo ve městě Marseille (Francie) k sérii znásilnění a okradení několika žen neznámým pachatelem. Na základě rozpoznání podoby pachatele zachyceného na videozáznamu a díky údajům získaných lokalizací mobilního telefonu, který byl ukraden jedné z obětí, byla policie přivedena na stopu dvou mužů, monozygotních dvojčat. Jednalo se o bratry Yohana a Elwina Gomisovi. Kvůli jejich fyzické podobnosti však nebylo možné určit, který z nich byl na videozáznamu zachycen. Jediným důkazem, kterým bylo možné pachatele odhalit, byly vzorky DNA zajištěné u obětí znásilnění. Genetická analýza vzorků však provedena nebyla, protože analýza by byla finančně velmi náročná a zároveň by nezaručila úspěšné identifikování pachatele. Vzhledem k dalším okolnostem případu byli oba bratři vzati do vazby (Lauter, 2013). Po deseti měsících se Yohan k činům přiznal, byl obviněn a Elwin byl z vazby propuštěn. Dodnes však není jisté, jestli byl potrestán správný pachatel a jestli se na činech nepodíleli oba dva bratři (Hopkins, 2015).

3.1.5 Možnosti rozlišení monozygotních dvojčat

3.1.5.1 Biometrie

Biometrie je věda, která se zabývá měřením a analýzou charakteristických tělesných nebo s chováním souvisejících rysů a používá se ke zjištění nebo potvrzení totožnosti osob. Mezi charakteristické tělesné rysy patří otisky prstů a dlaně, stav a otisk chrupu, tvar obličeje a dlaně, struktura a barva duhovky oka nebo schéma cévního zásobení sítnice oka. Mezi typické rysy spojené s chováním patří hlasový projev, mimika obličeje, styl chůze nebo dynamika písma (Jain *et al.*, 1999). Biometrie byla původně využívána především v kriminalistice, ale díky technickému rozvoji se začala uplatňovat i v běžném životě. Biometrické údaje (zejména otisky prstů, biometrické podpisy a skeny obličeje) se staly součástí zabezpečovacích elektronických systémů a v některých případech nahradily přístupová hesla k bankovním účtům, počítačům, mobilním telefonům, slouží ke kontrole vstupů do objektů nebo jsou součástí údajů cestovních dokladů (Borkar, 2012).

Biometrické rysy musí splňovat několik kritérií, aby je bylo možné použít ke spolehlivému rozlišení osob. Jedná se o univerzálnost rysu (každý člověk musí tento rys mít), stálost (rys by se neměl během života výrazně měnit), jedinečnost (rys by měl být charakteristický pouze pro jednoho člověka) a spolehlivost (rys by neměl být napodobitelný a nemělo by se s ním dát manipulovat) (Jain *et al.*, 1999). Ve skutečnosti však biometrické rysy nesplňují všechna kritéria v plném rozsahu a i s použitím moderních měřicích a snímacích zařízení může být výsledek analýzy neúspěšný. Nedostatky má zejména využití rysů souvisejících s chováním, které vykazují nízkou stálost a spolehlivost (Jain *et al.*, 1999).

Výzvu ve využití biometrie k identifikaci osob svou fyzickou podobností představují MZ dvojčata. Bylo však prokázáno, že jejich fenotypový projev může být natolik rozdílný, že je možné s využitím biometrie oba sourozence navzájem odlišit. Spolehlivým biometrickým rysem používaným k rozlišení MZ dvojčat jsou otisky prstů (Jain *et al.*, 2002; Tao *et al.*, 2012). Vzory otisků prstů se vytvářejí již v prenatalním období, jsou pro každého člověka jedinečné a během života se v zásadě nemění. Ke změně vzoru může dojít pouze následkem vážnějšího úrazu a zjizvení pokožky v místě poranění nebo po odstranění zárodečné vrstvy pokožky (Jain *et al.*, 2002; Kücken *et al.*, 2005). Podobně lze MZ rozlišit i na základě otisku celé dlaně (Kong *et al.*, 2006). Nejspolehlivějším biometrickým rysem vhodným k rozlišení MZ dvojčat jsou struktury oka, konkrétně struktura a stavba duhovky (Hollingsworth *et al.*, 2010)

a schéma prokrvení sítnice (Köse *et* Ikibas, 2011). Tyto struktury jsou jednak unikátní a neměnné během života, jednak není možné je úmyslně změnit či ovlivnit. Nevýhodou však zůstává finanční náročnost pořízení snímacího zařízení a možnosti získání dat v běžné forenzní praxi. Díky moderní technologii je možné rozlišit MZ dvojčata také na základě analýzy jejich hlasového projevu, při kterém je vyhodnocována výška a intenzita hlasu a doba, během které dojde k vytvoření zvuku hlasivkami (Ariyaeenia *et al.*, 2008). Analýza hlasu však patří k metodám méně spolehlivým, protože hlas se časem může výrazně měnit, lze ho ovlivnit a napodobit.

3.1.5.2 Celogenomové sekvenování

Možností rozlišení MZ dvojčat na genetické úrovni se teoreticky zabývali Krawczak a jeho kolegové (Krawczak *et al.*, 2012). Využili znalosti, že samčí zárodečné pohlavní buňky podstoupí oproti samičím asi o 365 buněčných dělení více, než dojde k jejich vývoji ve zralé pohlavní buňky (Drost *et* Lee, 1995). Existuje tak pravděpodobnost, že v případě MZ dvojčat mužského pohlaví dojde v zárodečné linii pohlavních buněk jednoho bratra během tolika dělení ke vzniku *de novo* mutace, kterou bude možné detekovat pouze v jeho pohlavních buňkách. Zároveň existuje alespoň 83% pravděpodobnost, že tato mutace bude přenesena i do jeho potomstva (Krawczak *et al.*, 2012).

Prakticky byla tato teorie ověřena o dva roky později pomocí celogenomového sekvenování jaderného genomu dvou MZ bratrů a dítěte jednoho z nich (Weber-Lehmann *et al.*, 2014). Celkem bylo odhaleno pět bodových polymorfismů, které byly přítomné pouze v genomu otce a jeho dítěte, ale ne v genomu strýce dítěte. Bylo tak potvrzeno, že po rozdělení zygoty na dvě embrya může docházet v zárodečných pohlavních buňkách MZ dvojčat ke vzniku mutací, které mohou být přeneseny do další generace, a které tak lze pomocí celogenomového sekvenování detekovat pouze u tohoto dvojčete a jeho potomka (Weber-Lehmann *et al.*, 2014). Celogenomové sekvenování by tak bylo možné využít jak při identifikaci MZ dvojčat, tak při řešení paternitních sporů s nařčenými MZ dvojčaty. V nedávné studii bylo také zjištěno, že MZ dvojčata je možné rozlišit i na základě detekce bodových polymorfismů v mitochondriálním genomu, opět s využitím metody celogenomového sekvenování (Wang *et al.*, 2015).

3.1.5.3 Epigenetické markery

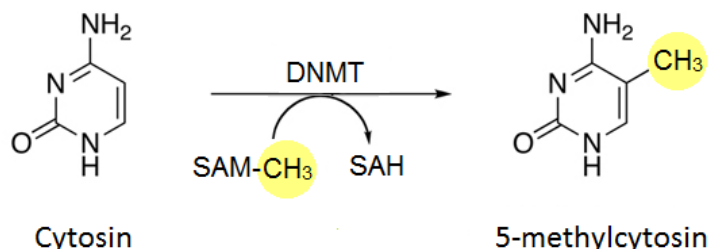
Jednou z příčin fenotypových rozdílů mezi MZ dvojčaty jsou drobné chemické modifikace struktury chromatinu a DNA, které však nemění samotnou nukleotidovou sekvenci. Jedná se o takzvané epigenetické změny, z nichž nejčastější je methylace DNA a methylace a acetylace histonů. Epigenetické mechanismy hrají důležitou roli v regulaci genové exprese a jsou nepostradatelné k normálnímu vývoji organismu (Bird, 2002). Na rozdíl od genetické informace jsou dynamické, protože podléhají působení vnějšího prostředí a s přibývajícím věkem MZ dvojčat se epigenetické rozdíly mezi nimi zvětšují (Fraga *et al.*, 2005; Kaminsky *et al.*, 2009; Talens *et al.*, 2012). Nejstudovanějším epigenetickým mechanismem je methylace DNA a bude jí věnována pozornost v další kapitole.

3.2 Epigenetické rozlišení MZ dvojčat

3.2.1 Methylace DNA

Methylace DNA představuje nejčastější epigenetický mechanismus, kterým je u většiny eukaryotních organismů regulována genová exprese. Jedná se o drobnou modifikaci DNA, která spočívá v kovalentní vazbě methylové skupiny na molekulu nukleotidu (Bird, 2002). K methylaci DNA dochází během reakce katalyzované enzymem DNA methyltransferázou (DNMT), která přenáší methylovou skupinu, pocházející ze substrátu S-adenosyl-L-methioninu (SAM), na pátý atom uhlíku pyrimidinového kruhu cytosinu, za vzniku 5-methylcytosinu (5-mC) (viz obrázek č. 4). 5-mC je někdy označován také jako „pátá báze“ DNA (Lister *et al.*, 2009). SAM je konvertován na S-adenosyl-L-homocystein (SAH), který je dále metabolicky zpracován a využit při syntéze aminokyseliny homocysteinu (Turner *et al.*, 2000).

Obrázek č. 4 – Zjednodušené schéma mechanismu methylace cytosinu. Upraveno podle Zhong *et al.*, 2016.



V genomech savců byly doposud identifikovány tři aktivní methyltransferázy: DNMT1, DNMT3A a DNMT3B (Chen *et al.*, 2004). DNMT1 má funkci udržování

methylace při replikaci DNA, kdy přenáší methylové skupiny na nově syntetizované nemethylované vlákno DNA podle methylovaného templátu (Leonhardt *et al.*, 1992). Naopak DNMT3A a DNMT3B mají schopnost methylace DNA *de novo* a vytvářejí prvotní methylační vzorce na nemethylované DNA. Jejich funkce je nezbytná pro normální vývoj jedince (Okano *et al.*, 1999).

K methylaci obvykle dochází v sekvencích, kde je nukleotid cytosinu (C) následován nukleotidem guaninu (G). Protože se jedná o sled nukleotidů, které se nacházejí na jednom vlákně DNA a které jsou navzájem spojeny fosfodiesterovou (*phosphodiester*, p) vazbou, jsou tyto sekvence zkráceně zapisovány jako CpG (Bird, 2002; Li *et al.*, 2014). Celkové zastoupení CpG v genomu je poměrně nízké, což souvisí s chemickou nestabilitou methylovaného cytosinu. Může totiž docházet ke spontánní deaminaci nestabilního 5-mC na thymín (T), čímž se CpG mění v TpG. V genomu bývají CpG soustředěny do oblastí o délce zhruba 1 kb, ve kterých je zastoupení C a G bází oproti zbytku genomu vyšší. Jedná se o takzvané CpG ostrůvky (Deaton *et al.*, 2011). Sekvence CpG ostrůvků zasahují do promotorových oblastí až 70 % konstitutivně exprimovaných genů a cytosiny v těchto oblastech nejsou zpravidla methylované (Saxonov *et al.*, 2006).

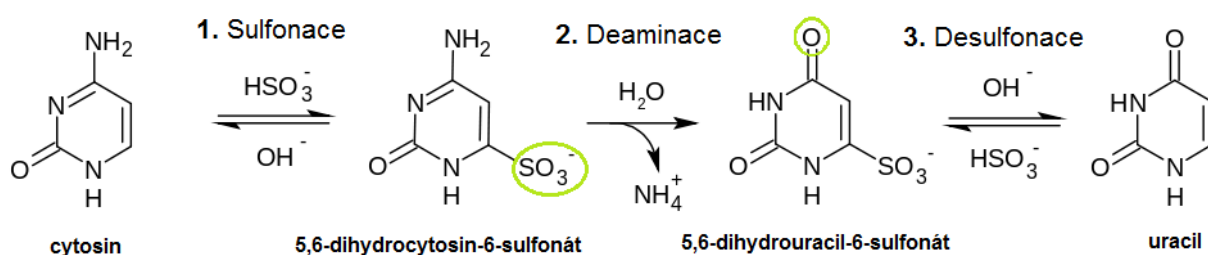
Methylace DNA představuje jeden z mechanismů, kterým je tlumena genová exprese. Methylová skupina totiž jednak zabraňuje navázání transkripčních faktorů k dané sekvenci, jednak představuje signál k navázání proteinů (*methyl-CpG binding domain proteins*, MBDs), které spouštějí represivní modifikaci histonů (Hug *et al.*, 1996; Bogdanović *et al.*, 2009). Mezi oblasti s nejvyšší hustotou 5-mC tak patří CpG sekvence genů inaktivovaných na chromozómu X u žen, CpG imprintovaných genů na jedné rodičovské alele a CpG repetitivních sekvencí centromer, telomer a mobilních elementů (Bird, 2002).

3.2.2 Bisulfitační konverze DNA

Většina technik methylační analýzy vyžaduje převedení epigenetické změny na změnu genetickou. Toho lze dosáhnout ošetřením templátu DNA hydrogensířičitanem sodným (*sodium bisulphite* nebo *sodium hydrogen sulphite*) – NaHSO₃, který deaminuje nemethylovaný cytosin na uracil, zatímco methylovaný cytosin je před touto změnou chráněn methylovou skupinou a přeměně nepodléhá. Během PCR je uracil párován s adeninem, a tak je amplifikován jako thymín, zatímco 5-methylcytosin zůstává amplifikován jako cytosin (Frommer *et al.*, 1992). Díky tomu je možné detekovat methylaci DNA až na úroveň jednoho nukleotidu (Gu *et al.*, 2010).

Ošetření DNA pomocí NaHSO_3 je nazýváno jako bisulfitační konverze (*bisulphite conversion*, BC) a má tři hlavní fáze – sulfonace, deaminace a desulfonace (viz obrázek č. 5). Nejdříve musí být DNA denaturována do jednovláknového stavu (*single stranded DNA*, ssDNA). Následuje sulfonace, během které dochází k navázání hydrogensířičitanového aniontu (HSO_3^-), pocházejícího z NaHSO_3 , na šestý atom uhlíku cytosinu, čímž vzniká 5,6-dihydrocytosin-6-sulfonát. Poté následuje deaminace, během které je z tohoto meziprojektu hydrolyticky odštěpena aminoskupina ($-\text{NH}_2$), a vzniká 5,6-dihydrouracil-6-sulfonát. Nakonec probíhá desulfonace, během které dochází k alkalickému odštěpení HSO_3^- , a vzniká tak konečný produkt – uracil (Patterson *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2012).

Obrázek č. 5 – Bisulfitační konverze nemetylovaného cytosinu na uracil. Upraveno podle Chan *et al.*, 2012.



Podmínky, ve kterých reakce BC probíhá (nízké pH, vysoká teplota), však nejsou pro DNA optimální a způsobují její částečnou degradaci (Tanaka *et Okamoto*, 2007). Podmínky reakce zároveň ovlivňují, s jakou účinností proběhne konverze C na U. K provedení BC je možné využít jak postup podle klasického protokolu (Patterson *et al.*, 2011), tak komerčně dostupné kity od různých firem – například EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, USA), EpiTect Bisulfite Kits (QIAGEN, Německo), EpiJET Bisulfite Conversion Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) nebo EpiMark® Bisulfite Conversion Kit (New England BioLabs, USA). Výhodou komerčních kitů je snížení časové i technické náročnosti provedení BC, vysoká účinnost konverze C na U (>98 %), přijatelné ztráty DNA i čistota DNA vhodná pro další analýzu (Holmes *et al.*, 2014).

3.2.3 Zkoumané oblasti genomu

V rámci epigenetického rozlišení MZ dvojčat byly doposud zkoumány oblasti repetitivních úseků DNA, které mají charakter mobilních genetických elementů (*mobile genetic elements*, MGEs). Jedná se o nekódující sekvence DNA,

kteře jsou v několika kopiích rozptýleny po celém genomu a představují asi 45 % celého lidského genomu (Lander *et al.*, 2001). Repetitivní sekvence obecně podléhají menšímu selekčnímu tlaku než sekvence unikátní, a proto vykazují větší genetickou i epigenetickou variabilitu mezi jedinci (Casa *et Gabellini*, 2012). Jakožto potenciální markery vhodné k epigenetickému rozlišení MZ dvojčat se v současné době zdají být konkrétně elementy LINE-1 (Xu *et al.*, 2015), *Alu-Sp* a *Alu-E2F3* (Stewart *et al.*, 2015).

Hlavním znakem mobilních elementů je jejich schopnost měnit svou pozici v genomu. Proces přemísťování mobilních elementů je označován jako transpozice, a proto jsou MGEs nazývány také jako transpozóny. Podle způsobu transpozice jsou transpozóny rozděleny do dvou tříd – třída I (RNA transpozóny) a třída II (DNA transpozóny). RNA transpozóny se v genomu šíří prostřednictvím RNA meziprojektu, procesem retrotranspozice. DNA transpozóny obsahují sekvenci kódující gen pro enzym transpozázu, která katalyzuje proces vystřižení transpozónu a jeho vložení na jiné místo v genomu (Erwin *et al.*, 2014). DNA transpozóny v lidském genomu jsou však považovány za inaktivní (Lander *et al.*, 2001).

Transpozóny jsou dále klasifikovány na základě přítomnosti či nepřítomnosti genů potřebných k transpozici. V případě, že transpozóny kódují všechny sekvence nezbytné k transpozici, jsou označovány jako autonomní. Opakem jsou neautonomní transpozóny, jejichž transpozice je částečně nebo úplně závislá na jiných elementech (Slotkin *et Martienssen*, 2007).

3.2.3.1 LINE elementy

Dlouhé rozptýlené jaderné elementy (*long interspersed nuclear elements*, LINEs) představují skupinu autonomních, které tvoří asi 21 % lidského genomu (Lander *et al.*, 2001). Všechny LINEs kódují ve své sekvenci gen pro reverzní transkriptázu (RT) a podle fylogenetického původu RT jsou rozděleny do pěti nadrodin – R2, L1, RTE, I a Jockey (Wicker *et al.*, 2007). V lidském genomu jsou aktivní pouze elementy z nadrodiny L1, nazývané také jako LINE-1 elementy. LINE-1 se v genomu nacházejí asi v 500 000 kopiích a tvoří tak zhruba 17 % celého genomu (Lander *et al.*, 2001). Z tohoto počtu kopií jich je však jen asi 100 aktivních. Velmi často totiž dochází k chybné retrotranspozici, k přestavbám struktury elementů nebo ke vzniku mutací v jejich sekvenci. Takové elementy pak neobsahují kompletní nebo funkční sekvence potřebné k retrotranspozici (Brouha *et al.*, 2003).

3.2.3.2 SINE elementy

Krátké rozptýlené jaderné elementy (*short interspersed nuclear elements*, SINEs) představují skupinu neautonomních RNA transpozónů, jejichž retrotranspozice je závislá na proteinech kódovaných LINE elementy. SINEs jsou na základě podobnosti v nukleotidové sekvenci rozdělovány do rodin, z nichž nejvýznamnější a nejpočetnější je rodina *Alu* elementů, typická pouze pro primáty. Název *Alu* byl odvozen podle toho, že všechny elementy patřící do této rodiny obsahují rekogniční místo pro restriktivní endonukleázu *AluI* (izolovanou z grampozitivní bakterie *Arthrobacter luteus*) (Khitrinskaya *et al.*, 2003). V lidském genomu se *Alu* elementy nacházejí zhruba v milionu kopiích, a představují tak asi 11 % genomu (Lander *et al.*, 2001).

Sekvence *Alu* elementů se od sebe nepatrně liší. V různých obdobích evoluce totiž docházelo ke vzniku mutací, které jsou charakteristické jen pro určitou skupinu *Alu* elementů. Skupiny nesoucí společnou mutaci jsou označovány jako podrodiny a jsou rozdělovány do tří hlavních linií – *AluJ* (nejstarší linie), *AluS* a *AluY* (nejmladší linie). I v rámci jedné podrodiny se však v sekvencích elementů mohou vyskytnout drobné rozdíly. Varianty elementů z jedné podrodiny se označují písmenem, číslem nebo kombinací obojího za názvem hlavní linie. V lidském genomu převažují elementy z podrodiny *AluS* (varianty *Alu-Sp*, *Alu-Sc*, *Alu-Sx* a *Alu-Sq*) a *AluY* (varianty *AluYa5* a *AluYb8*) (Batzer *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2016).

3.2.4 Metody použité k epigenetickému rozlišení MZ dvojčat

3.2.4.1 Bisulfitové pyrosekvenování

Bisulfitové pyrosekvenování představuje citlivou a přesnou metodu detekce methylace DNA u krátkých sekvencí. Vzorek DNA musí být nejprve ošetřen bisulfitací konverzí a následně je amplifikován párem primerů, z nichž jeden je biotinylován, čímž dochází k imobilizaci biotinylovaného primeru a amplifikované sekvence na kuličky se streptavidinem. Následně jsou ke směsi postupně přidávány deoxynukleotidtrifosfáty. Pokud dojde k začlenění komplementárního nukleotidu do imobilizované amplifikované sekvence, dojde k uvolnění pyrofosfátu. Pyrofosfát je enzymem sulfurylázou přeměněn na adenosintrifosfát (ATP). ATP je enzymem luciferázou použit k oxidaci luciferinu, čímž dochází k uvolnění světelného signálu, který je snímán kamerou. Intenzita světelného signálu proporcčně odpovídá počtu začleněných nukleotidů a signál je zobrazen jako pík. Pokud nukleotid začleněn není, je degradován enzymem apyrázou a odmyt. Výsledkem analýzy je pyrogram. Výhodou

bisulfitového sekvenování je kvantitativní vyjádření stavu methylace a informace o poloze methylovaného nukleotidu v rámci sekvence (Bassil *et al.*, 2013).

Bisulfitové pyrosekvenování bylo úspěšně využito k rozlišení MZ dvojčat na základě detekce rozdílů v methylaci LINE-1 elementů (Xu *et al.*, 2015).

3.2.4.2 MS-HRM

Methylačně specifická vysokorozlišovací analýza křivek tání (*methylation-sensitive high resolution melting*, MS-HRM) představuje citlivou, rychlou a finančně poměrně nenákladnou metodu analýzy methylace DNA. MS-HRM využívá rozdílné teploty tání dvouvláknových PCR produktů vzniklých amplifikací bisulfitovaného templátu DNA.

Teplota tání (*melting temperature*, T_m) je definována jako teplota, při které je právě polovina PCR produktů denaturována z dvouvláknové formy na formu jednovláknovou. Hodnota T_m závisí na nukleotidovém složení sekvence, protože podíl jednotlivých nukleotidů určuje pevnost vazby obou komplementárních vláken DNA. Cytosin a guanin je spojen trojnou vazbou a adenin s thyminem vazbou dvojnou. K rozdělení trojné vazby je potřeba vyšší teplota než k rozdělení dvojné vazby, proto čím je podíl C a G v sekvenci vyšší, tím vyšší T_m sekvence má. K detekci rozdílů v T_m slouží saturační fluorescenční barvivo, které se rovnoměrně interkaluje mezi komplementární vlákna DNA. Při denaturaci vláken se barvivo uvolňuje a dochází k poklesu fluorescenčního signálu, který je zaznamenán fluorescenčním detektorem. Výsledkem procesu je křivka tání, která zobrazuje změny fluorescence v závislosti na teplotě (Wittwer *et al.*, 2003).

Po bisulfitační konverzi a PCR amplifikaci DNA se u nemethylovaných úseků mění poměr zastoupení bází ve prospěch A a T, a tak sekvence s nižším stupněm methylace vykazuje nižší T_m než sekvence methylovaná. Pomocí MS-HRM není možné lokalizovat methylovaná místa, ale je možné stupeň methylace vyjádřit alespoň procentuálně, pomocí sestavení diluční řady methylované a nememethylované DNA o známém stupni methylace a porovnáním zkoumaných vzorků se vzorky o známém stupni methylace (Wojdacz *et Dobrovic*, 2007; Wojdacz *et al.*, 2008).

MS-HRM byla úspěšně použita k rozlišení MZ dvojčat na základě rozdílů v methylaci dvou SINE elementů, konkrétně elementu *Alu-E2F3* a *Alu-Sp* (Stewart *et al.*, 2015).

4 Materiál a metodika

4.1 Přístroje

- Laminární box Mars Safety Class 2 (LaboGene, Dánsko)
- Centrifuga: Centrifuge 5430 (Eppendorf, Německo), MiniSpin (Eppendorf, Německo), Rotina 420 R (Hettich, Německo)
- Vortex VX-200 (Labnet, USA)
- Spektrofotometr NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA)
- Termocyklér: CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA), LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche, USA), Peltier Thermal Cycler PTC-200 (Bio-Rad, USA)
- Termoblok Bio TDB-100 (Biosan, USA)
- Chladnička s mrazničkou (Liebherr, Německo)

4.2 Programy a software

- BiSearch Primer search, ePCR (Tusnády *et al.*, 2005)
- NanoDrop 1000 Software (Thermo Scientific, USA)
- LightCycler® 480 Software, Version 1.5 (Roche, USA)
- GeneMarker HID V2.2.0 (Holland *et Parson*, 2011)
- CFX Manager™ Software (Bio-Rad, USA)
- Precision Melt Analysis™ Software (Bio-Rad, USA)
- Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft Corporation, USA)

4.3 Pomůcky

- Pipeta 0,1 – 2,5 µl, 0,5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 10 – 100 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf, Německo)
- Klasický a chladicí stojan na zkumavky a mikrozukavky (P-LAB, ČR)
- Sterilní pinzeta

4.4 Spotřební materiál

- Špičky s dvojitým filtrem 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 1000 µl (Eppendorf, Německo)
- Mikrozukavky 1,5 ml a 0,2 ml (Eppendorf, Německo)
- 96-jamkové pipetovací destičky a krycí fólie (Bio-Rad, USA)
- Stěrové tyčinky SK-4S (Isohelix, Velká Británie)
- Silikagelové kuličky o průměru 0,5 – 1 mm (Sigma-Aldrich, USA)

4.5 Chemikálie a roztoky

- Kit pro izolaci DNA – Quick-gDNA™ MicroPrep (Zymo Research, USA)
- β-merkapt ethanol (Bio-Rad, USA)
- Kit pro STR analýzu – PowerPlex® 18D System (Promega, USA)
- Kit pro bisulfitační konverzi DNA – EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo Research, USA)
- Voda ošetřená DEPC
- Absolutní ethanol pro UV spektroskopii (Penta, ČR)
- 10x PCR pufr (Thermo Scientific, USA)
- 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific, USA)
- 25 mM směs dNTPs (Bioline, Velká Británie)
- 20x EvaGreen® Dye (Biotium, USA)
- 100 μM reverse a forward primery (Generi Biotech, ČR)
- 5 U/μl Thermo Taq DNA polymeráza (Thermo Scientific, USA)

4.6 Biologický materiál

V rámci časosběrného pokusu byla použita DNA izolovaná z buněk bukální sliznice jednoho páru monozygotních dvojčat a jedné osoby nepříbuzné páru dvojčat (způsob odběru vzorků a postup izolace DNA je uveden níže). Od obou dvojčat byl získán informovaný souhlas s odběrem, uchováním a epigenetickým vyšetřením jejich biologického materiálu. Tento formulář byl schválen etickou komisí FN a LF UP Olomouc. Monozygotnost dvojčat byla ověřena STR analýzou za použití kitu Power Plex 18 D System (Promega, USA), jak bude popsáno níže. Dále byla použita DNA izolovaná firmou Generi Biotech (ČR) z bukálních stěrů patnácti osob nepříbuzných páru dvojčat, které souhlasily s uchováním a genetickým vyšetřením jejich biologického materiálu. Jako pozitivní a negativní kontrola byl použit komerční standard methylované a nemethylované lidské DNA – Human Methylated & Non-methylated DNA Set (Zymo Research, USA).

4.6.1 Odběr vzorků

Odběr vzorků od obou dvojčat a jedné nepříbuzné osoby byl prováděn pravidelně jednou týdně po dobu 30 týdnů. K odběru byly použity sterilní stěrové tyčinky a 1,5 ml mikrozkušavky obsahující zhruba 20 desikačních silikagelových kuliček. Odběr byl prováděn stíráním buněk bukální sliznice z vnitřní strany pravé i levé tváře. Stěr byl prováděn otáčivým a zároveň posuvným pohybem tyčinky po bukální sliznici po dobu 30 s. Tyčinky byly následně zalomeny do připravených zkušavek

s desikantem, zkumavky byly uzavřeny a uchovány při pokojové teplotě. Do 24 hod od odběru byly vzorky převezeny do laboratoře a umístěny do mrazničky, kde byly skladovány při -20 °C. Odběr prováděla dvojčata i nepříbuzná osoba samy, vždy ve stejný den.

4.6.2 Izolace DNA

Vzorky bukálních stěrů byly rozmrazeny a zalomené tyčinky byly sterilní pinzetou přeneseny do čistých 1,5 ml mikrozkmavek. Následně byla provedena izolace DNA pomocí kitu Quick-gDNA™ MicroPrep (Zymo Research, USA) podle návodu doporučeného výrobcem. Do postupu byl zařazen dodatečný krok předcházející přidání elučního pufru na kolonku, a sice centrifugace kolonky po dobu 1 min při 16 000 x g. Tímto dodatečným krokem byl odstraněn zbytek promývacího pufru z kolonky. K eluci DNA bylo použito 20 µl elučního pufru. Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky. Izolovaná DNA byla uchovávána v mrazničce při -20 °C.

4.6.3 Test monozygotnosti dvojčat

Monozygotnost dvojčat byla ověřena analýzou osmnácti STR lokusů s použitím kitu Power Plex 18D System (Promega, USA). Postup amplifikace vzorků byl proveden podle návodu doporučeného výrobcem kitu, přičemž celkový objem reakce byl zredukován na polovinu (z původních 25 µl na 12,5 µl) a do reakce byly vloženy 2 µl vzorku DNA o koncentraci 0,5 ng/µl. Celkem byly analyzovány čtyři vzorky – pozitivní kontrola (2800 M Control DNA, která je součástí kitu), vzorky DNA obou dvojčat a negativní kontrola (namísto vzorku DNA byla použita voda). Vzorky byly amplifikovány pomocí PCR programu uvedeného v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1 – Teplotní a časový průběh PCR programu pro amplifikaci STR lokusů.

Teplota	Čas	Počet cyklů
96 °C	2 min	1
94 °C	10 s	30
60 °C	1 min	
60 °C	20 min	1
4 °C		

Amplifikované vzorky byly skladovány při -20 °C a poté byly zaslány do firmy SEQme s. r. o. (ČR), kde byla provedena jejich fragmentační analýza pomocí kapilární elektroforézy.

4.7 Detekce methylace pomocí MS-HRM

4.7.1 Bisulfitační konverze DNA

Všechny zkoumané vzorky i standard methylované a nemethylované DNA byly ošetřeny bisulfitační konverzí. K bisulfitační konverzi byl použit kit EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo Research, USA) a postup byl proveden podle návodu doporučeného výrobcem kitu. Vstupní množství DNA pro konverzi bylo 75 ng a k eluci DNA bylo použito 10 µl elučního pufru. Konvertovaná DNA byla skladována při -20 °C nejdéle po dobu tří týdnů.

4.7.2 Primery pro PCR amplifikaci

Na základě informací dostupných v literatuře bylo ke sledování epigenetického stavu dvojčat vybráno sedm úseků lidského genomu a z literatury byly také převzaty sekvence primerů amplifikujících daný úsek bisulfityvané DNA. Byly vybrány úseky s odpovídajícími sekvencemi primerů: LINE-1 (Xu *et al.*, 2015) a *Alu-Sx*, *Alu-Sp*, *Alu-E2F3*, *PKD1P2*, *Alu-Sc*, *GUK1* (Fraga *et al.*, 2005). Specifita vybraných primerů byla ověřena pomocí BiSearch ePCR (Tusnády *et al.*, 2005). Primery byly po doručení v lyofilizovaném stavu rozpuštěny v 10 mM Tris-HCl na koncentraci 100 µM, inkubované 10 min při 70 °C a následně skladovány při -20 °C. Smícháním příslušného F (forward) a R (reverse) primeru v poměru 1:1 byla pro každý úsek připravena primerová směs (*primer mixture*, PM). Každá PM byla označena číselným kódem. Charakteristika primerových směsí je uvedena v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2 – Seznam a charakteristika primerových směsí (PM) použitých pro PCR amplifikaci zkoumaných úseků genomu.

PM	Zkoumaný úsek	Směr primeru	Sekvence primeru	Délka [nt]	Amplikon [bp]
555	LINE-1	F R	AAAATCAAAAAATCCCTTTC TTTTGAGTTAGGTGTGGGATATA	21 23	146-148
556	<i>Alu-Sx</i>	F R	GGTGGGAGGTTTAGGTATGG ACACTTAAAAAACCCCTCAACCCAC	20 25	373-388
557	<i>Alu-Sp</i>	F R	TTTGGTGATTAGGAAGGyGGGTA AAACTAATCTCAAACCTCCCTACCTC	23 25	387
558	<i>Alu-E2F3</i>	F R	GGTAATAATTTTAAAATTTGGGGGT ATTAATAAACCAATCAACCCrTAA	25 25	174
559	<i>PKD1P2</i>	F R	GGGGAAATTGAGGTATAGAGAG ATAAAAAACTCTACCCTTAACCTATC	22 26	206
560	<i>Alu-Sc</i>	F R	TTTAGGTTGGAGTGTAGAGGTA AACTAAACAATACACACrCCTC	22 22	-
561	<i>GUK1</i>	F R	GGTTAGyGAGGTATTGAGGTAAGT CCrTTCTCAAACCCACAATTAATAC	24 27	370

Legenda: y odpovídá C nebo T; r odpovídá A nebo G; R odpovídá směru reverse; F odpovídá směru forward.

4.7.3 Příprava PCR reakční směsi

PCR reakční směs byla připravena podle rozpisu uvedeného v tabulce č. 3. S ohledem na počet testovaných vzorků byl objem PCR reakční směsi vypočítán podle vzorce: $x \cdot 1,17 \cdot y$, kde x odpovídá počtu testovaných vzorků, číslo $1,17$ odpovídá předem určenému faktoru a y odpovídá celkovému objemu PCR reakční směsi v jedné reakci. Celkový objem jedné reakce byl 10 μ l.

Tabulka č. 3 – Složení PCR reakční směsi pro 96 reakcí.

Reagencie	Finální koncentrace	Objem [μ l]
DEPC H ₂ O	-	350
PCR pufr	1x	112,3
MgCl ₂	3mM	135,3
dNTPs	200 μ M	9
Thermo Taq DNA polymeráza	1U/reakce	11,2
Eva Green® Dye	1x	56,2
CELKEM		674

Dále byla vodou naředěna každá PM na koncentraci 5 μ M a každý vzorek bisulfitované DNA a vzorek nebisulfitované nemethylované DNA na koncentraci 2,5 ng/ μ l.

Připravená PCR reakční směs byla rozdělena po 6 μ l na 96-jamkovou destičku. Ke směsi byly přidány 2 μ l naředěné PM a 2 μ l naředěného vzorku DNA. Finální koncentrace PM v reakci tedy byla 1 μ M a finální koncentrace DNA byla 500 pg/ μ l. Každý vzorek byl na destičku nanášen v duplikátu. Jako pozitivní kontrola správného průběhu reakce a bisulfitační konverze byl použit bisulfitovaný standard methylované a nemethylované DNA. Jako negativní kontrola byl použit nebisulfitovaný standard nemethylované DNA. Destička byla překryta fólií, krátce stočena na centrifuze a vložena do termocykléru s nastaveným programem.

4.7.4 Nastavení PCR programu

K analýze všech zkoumaných úseků byl použit jeden PCR protokol, jehož časový a teplotní průběh je uveden v tabulce č. 4. K zajištění specifické amplifikace všech úseků byl do protokolu zařazen PCR touchdown program.

Tabulka č. 4 – Teplotní a časový průběh PCR programu.

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Aktivace polymerázy	95 °C	15 min	1
Touchdown	95 °C	15 s	10
	63 → 54 °C	50 s	
	72 °C	20 s	
PCR amplifikace	95 °C	15 s	15
	54 °C	50 s	
	72 °C	20 s	
Denaturace	95 °C	15 s	1
Hybridizace	60 °C	1 min	
Melting po 25 cyklech	60 → 95 °C	přírůstek 0,5 °C/s	
PCR amplifikace	95 °C	15 s	5
	54 °C	50 s	
	72 °C	20 s	
Denaturace	95 °C	15 s	1
Hybridizace	60 °C	1 min	
Melting po 30 cyklech	60 → 95 °C	přírůstek 0,5 °C/s	
PCR amplifikace	95 °C	15 s	5
	54 °C	50 s	
	72 °C	20 s	
Denaturace	95 °C	15 s	1
Hybridizace	60 °C	1 min	
Melting po 35 cyklech	60 → 95 °C	přírůstek 0,5 °C/s	
PCR amplifikace	95 °C	15 s	5
	54 °C	50 s	
	72 °C	20 s	
Denaturace	95 °C	15 s	1
Hybridizace	60 °C	1 min	
Melting po 40 cyklech	60 → 95 °C	přírůstek 0,5 °C/s	
PCR amplifikace	95 °C	15 s	5
	54 °C	50 s	
	72 °C	20 s	
Denaturace	95 °C	15 s	1
Hybridizace	60 °C	1 min	
Melting po 45 cyklech	60 → 95 °C	přírůstek 0,5 °C/s	
PCR amplifikace	95 °C	15 s	5
	54 °C	50 s	
	72 °C	20 s	
Denaturace	95 °C	15 s	1
Hybridizace	60 °C	1 min	
Melting po 50 cyklech	60 → 95 °C	přírůstek 0,5 °C/s	
Chlazení	37 °C	1 s	1

5 Výsledky

5.1 Ověření monozygotnosti dvojčat

Ověření monozygotnosti dvojčat bylo provedeno klasickou STR analýzou za použití kitu PowerPlex® 18D System (Promega, USA) a následnou fragmentační analýzou vzorků pomocí kapilární elektroforézy. Výsledek analýzy vyhodnotil doc. Mgr. Jiří Drábek, PhD. s použitím programu GeneMarker HID V2.2.0. Monozygotnost dvojčat byla potvrzena shodou dvojčat ve všech 18 analyzovaných STR lokusech. Jednalo se o 13 lokusů uvedených v systému CODIS (D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, D8S1179, vWA, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818) a pět dodatečných lokusů (Amelogenin, Penta E, Penta D, D2S1338 a D19S433). Výsledky analýzy nejsou z důvodu ochrany osobních údajů v této práci zveřejněny.

5.2 Detekce methylace pomocí MS-HRM

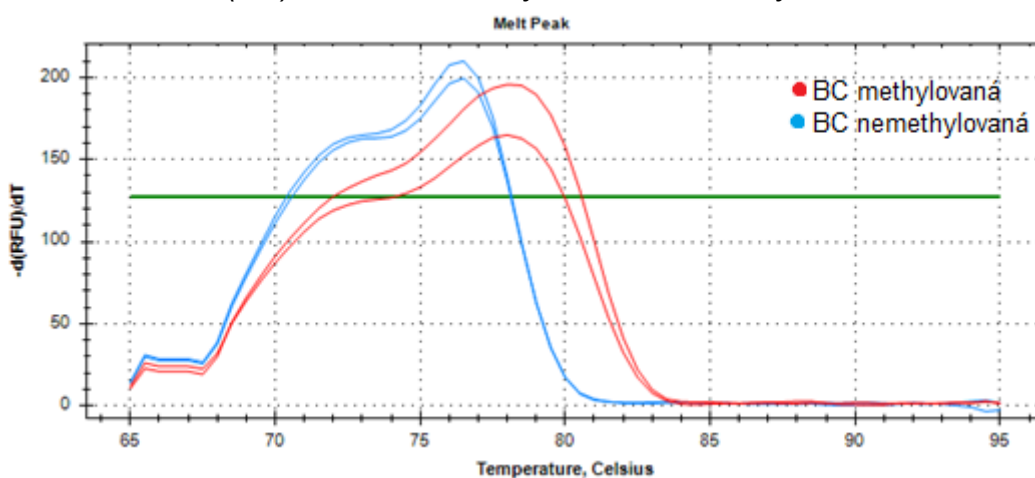
V experimentální části byla provedena izolace DNA z bukálních stěrů pomocí kitu Quick-gDNA™ MicroPrep (Zymo Research, USA), bisulfitační konverze vzorků DNA pomocí kitu EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo Research, USA) a detekce methylace pomocí HRM s použitím termocykléru CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA).

K detekci methylace bylo předběžně vybráno sedm úseků lidského genomu (LINE-1, *Alu-Sx*, *Alu-Sp*, *Alu-E2F3*, *PKD1P2*, *Alu-Sc* a *GUK1*). Analýza byla nejdříve provedena ze vzorky methylovaného a nemethylovaného standardu a poté se vzorky z bukálních stěrů. K analýze všech sledovaných úseků byl vytvořen jeden PCR protokol, který zahrnoval PCR touchdown program a šest kroků analýzy křivek tání oddělených pěti cykly standardní PCR amplifikace. Pro každý úsek byl určen optimální počet cyklů amplifikace, po kterých byla hodnocena křivka a teplota tání (T_m) daného amplikonu. Hodnocení křivek tání bylo provedeno za použití programu Precision Melt Analysis™ Software (Bio-Rad, USA). Pro přehlednější hodnocení výsledků byly křivky tání v programu zobrazeny pomocí derivace křivky, kdy je teplota v inflexním bodě zobrazena jako vrchol píku.

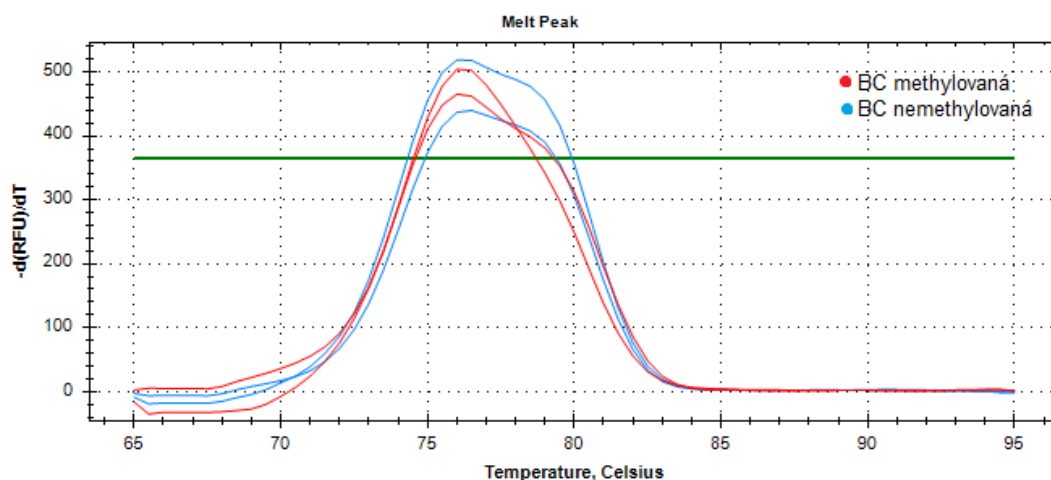
5.2.1 MS-HRM u standardů DNA

K experimentálnímu ověření specifity použitých primerových sekvencí byla provedena analýza křivek tání příslušných produktů amplifikovaných na templátu methylovaného a nemethylovaného standardu DNA. Na základě výsledků byly z další analýzy vyřazeny primerové sekvence amplifikující úsek LINE-1 a GUK1. U těchto úseků byl na průběhu křivky tání amplikonů patrný vznik nespécifických produktů nebo více meltingových domén (viz obrázek č. 10 a 11), které by znemožnily hodnocení výsledku pomocí T_m .

Obrázek č. 10 – Derivace křivky tání úseku LINE-1 amplifikovaného na templátu bisulfitovaného (BC) standardu methylované a nemethylované DNA.



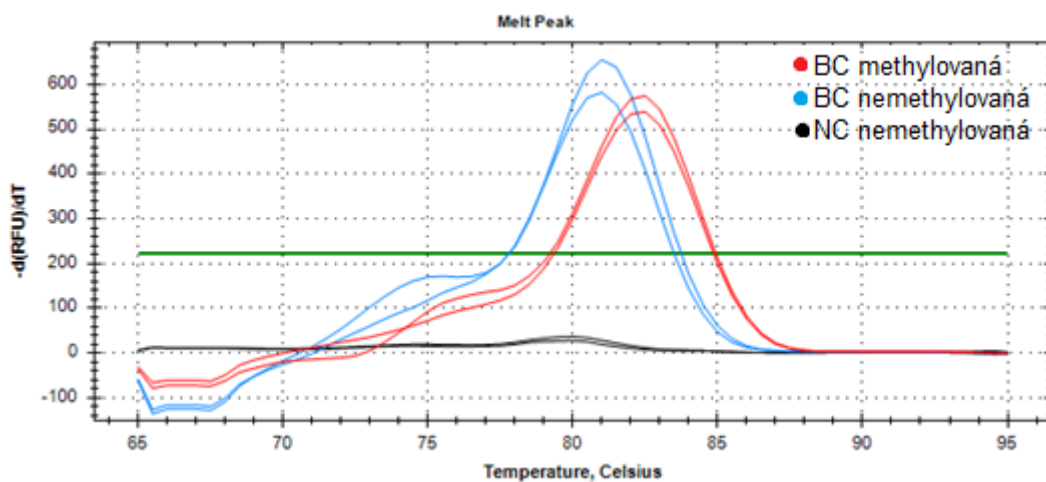
Obrázek č. 11 – Derivace křivky tání úseku GUK1 amplifikovaného na templátu bisulfitovaného (BC) standardu methylované a nemethylované DNA.



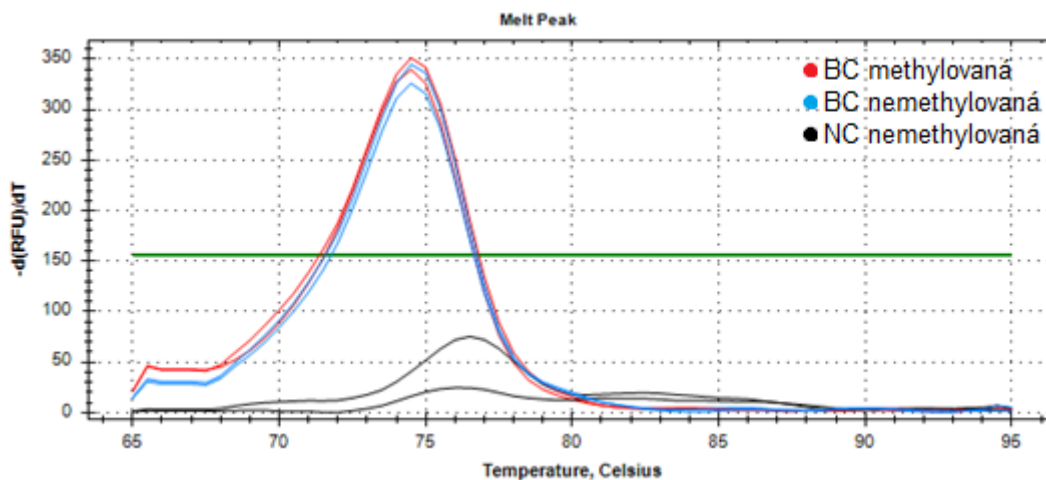
U zbylých úseků (*Alu-Sp*, *Alu-Sx*, *Alu-E2F3*, *PKD1P2* a *Alu-Sc*) byla provedena amplifikace na templátu bisulfitovaného metylovaného a nemetylovaného standardu a na templátu nebisulfitovaného nemetylovaného a metylovaného standardu DNA. U amplikonů z bisulfitovaných templátů byl pozorován standardní průběh křivek tání, přičemž křivka tání byla u úseků *Alu-E2F3*, *PKD1P2* a *Alu-Sc* hodnocena po 35 cyklech amplifikace, u úseku *Alu-Sx* po 30 cyklech a u úseku *Alu-Sp* po 40 cyklech. K detekci signálu u nebisulfitovaných vzorků docházelo oproti bisulfitovaným v případě všech úseků se zpožděním nejméně 10 cyklů a z průběhu křivek tání nebisulfitovaných vzorků byl patrný vznik nespecifických produktů, jejichž T_m byla oproti teplotám bisulfitovaných vzorků o 2 – 5 °C nižší. Bisulfitované standardy tak sloužily jako pozitivní kontroly správného průběhu reakce i účinnosti bisulfitovací konverze testovaných vzorků DNA z bukálních stěrů. U úspěšně bisulfitovaných vzorků byly očekávány T_m v rozmezí T_m bisulfitovaného nemetylovaného a metylovaného standardu. Nebisulfitovaný standard sloužil jako negativní kontrola.

U zkoumaných úseků byly pozorovány pouze malé rozdíly v T_m amplikonů z metylovaného a nemetylovaného templátu. U úseků *Alu-Sx* a *Alu-Sp* nebyl pozorován žádný rozdíl v T_m mezi amplikony z metylovaného a nemetylovaného templátu. V případě *Alu-Sx* byla T_m obou amplikonů rovna 82,0 °C (viz obrázek č. 12) a v případě *Alu-Sp* 74,5 °C (viz obrázek č. 13). U úseku *Alu-E2F3* a *Alu-Sc* byl pozorován rozdíl v T_m obou amplikonů pouze 0,5 °C. V případě *Alu-E2F3* byla T_m amplikonu z metylovaného templátu 74,0 °C a z nemetylovaného 73,5 °C (viz obrázek č. 14). V případě *Alu-Sc* byla T_m amplikonu z metylovaného templátu 76,5 °C a z nemetylovaného 76,0 °C (viz obrázek č. 16). U úseku *PKD1P2* byl pozorován rozdíl 1,5 °C, kdy T_m metylovaného amplikonu byla 80,0 °C a z nemetylovaného 78,5 °C (viz obrázek č. 15).

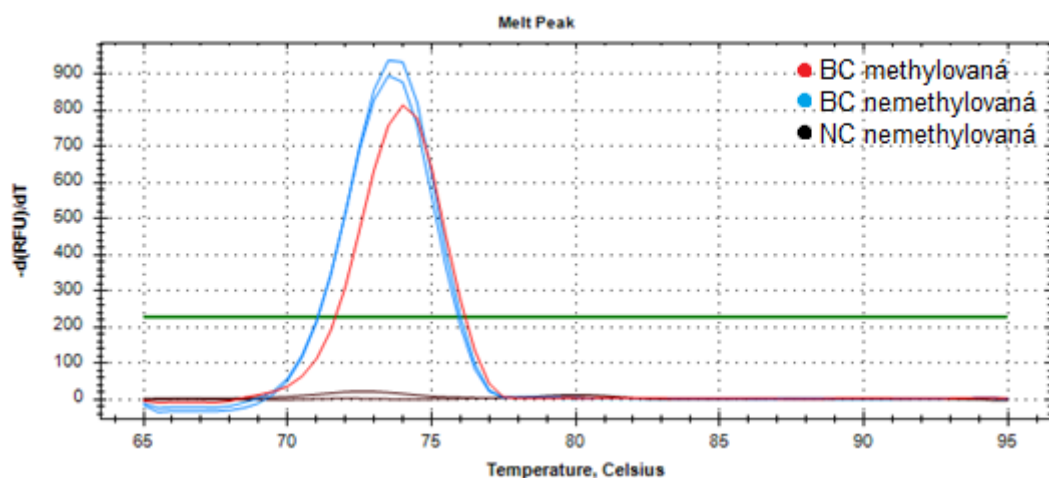
Obrázek č. 12 – Derivace křivky tání úseku Alu-Sx amplifikovaného na templátu bisulfitovaného (BC) standardu methylované a nemethylované DNA a na templátu nebisulfitovaného (NC) standardu nemethylované DNA.



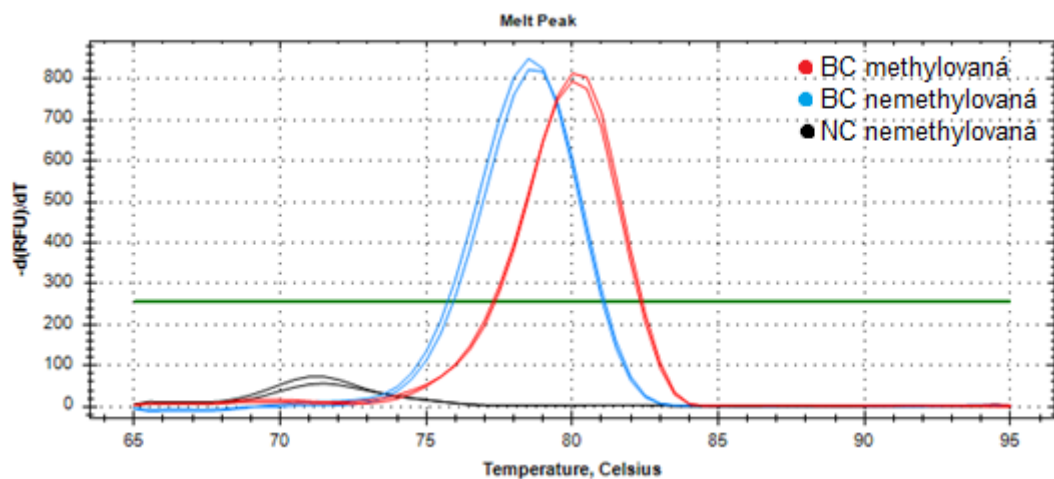
Obrázek č. 13 – Derivace křivky tání úseku Alu-Sp amplifikovaného na templátu bisulfitovaného (BC) standardu methylované a nemethylované DNA a na templátu nebisulfitovaného (NC) standardu nemethylované DNA.



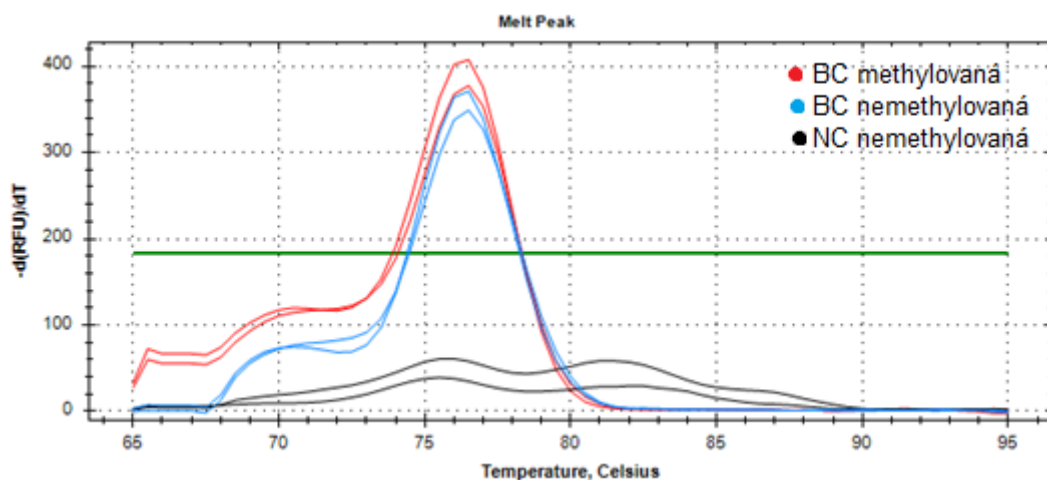
Obrázek č. 14 – Derivace křivky tání úseku Alu-E2F3 amplifikovaného na templátu bisulfitovaného (BC) standardu methylované a nemethylované DNA a na templátu nebisulfitovaného (NC) standardu nemethylované DNA.



Obrázek č. 15 – Derivace křivky tání úseku PKD1P2 amplifikovaného na templátu bisulfitovaného (BC) standardu methylované a nemethylované DNA a na templátu nebisulfitovaného (NC) standardu nemethylované DNA.



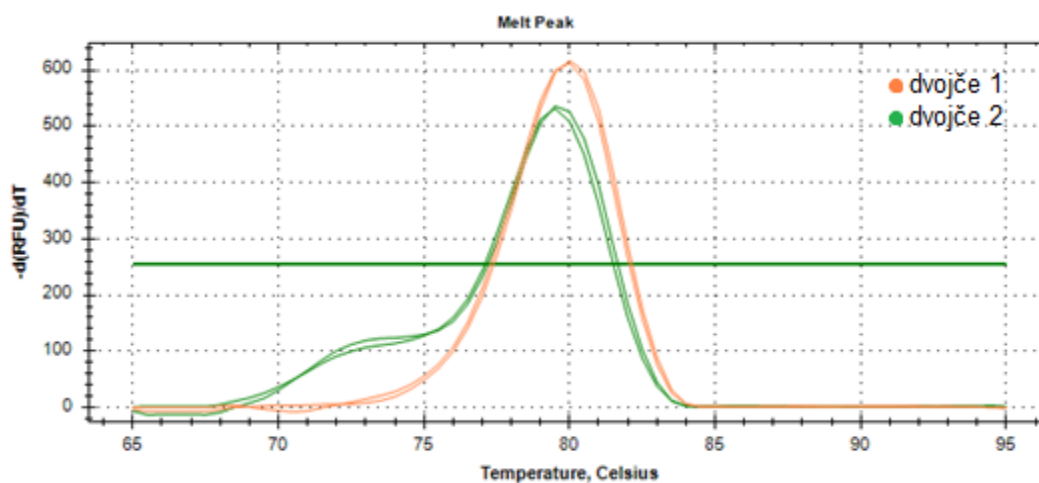
Obrázek č. 16 – Derivace křivky tání úseku *Alu-Sc* amplifikovaného na templátu bisulfitovaného (BC) standardu methylované a nemethylované DNA a na templátu nebisulfitovaného (NC) standardu nemethylované DNA.



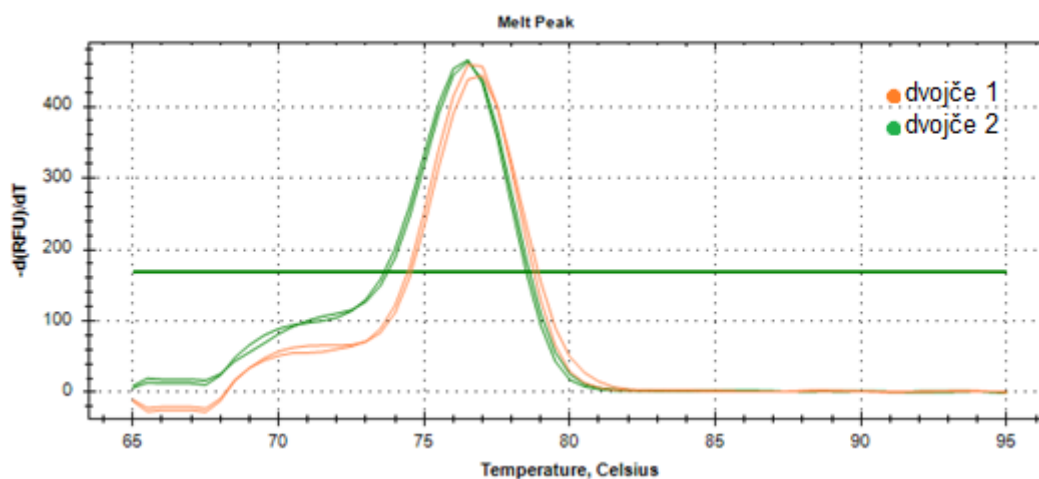
5.2.2 MS-HRM u vzorků z bukálních stěrů

V rámci časosběrného pokusu sledování epigenetického stavu dvojčat u pěti zvolených úseků byly pozorované změny v T_m amplifikovaných úseků pouze nepatrné. U úseků *Alu-Sp* a *Alu-E2F3* nebyly pozorovány žádné změny v T_m amplikonů ani v rámci sledování T_m úseku jednoho dvojčete, ani mezi dvojčaty navzájem. Teplota tání byla v každém týdnu u každého dvojčete i nepříbuzné osoby v případě *Alu-Sp* rovna 74,5 °C a v případě *Alu-E2F3* byla pokaždé rovna 74,0 °C. U úseku *Alu-Sx* byl pozorován pouze nepatrný rozdíl v T_m , kdy během třiceti týdnů došlo u dvojčat i nepříbuzné osoby maximálně ke dvěma snížením T_m o 0,5 °C z teploty 82,0 °C na 81,5 °C. Podobné výsledky byly zaznamenány také u úseku *Alu-Sc*, kdy u jednoho dvojčete byly zaznamenány dva poklesy v T_m o 0,5 °C z teploty 76,5 °C na 76,0 °C, u druhého dvojčete bylo takových poklesů zaznamenáno pět a u nepříbuzné osoby čtyři. Nejvíce rozdílů v T_m bylo zaznamenáno u úseku *PKD1P2*, kdy bylo u jednoho dvojčete během třiceti týdnů pozorováno dvanáct změn v T_m z 80,0 °C na 79,5 °C a u druhého dvojčete bylo takových změn pozorováno čtrnáct. U nepříbuzné osoby se v případě úseku *PKD1P2* hodnoty T_m pohybovaly v rozmezí 79,5 °C a 79,0 °C, přičemž hodnota 79,0 °C byla naměřena pouze třikrát. Výsledky teplot tání zaznamenaných během třiceti týdnů u sledovaných úseků *Alu-Sx*, *Alu-Sp*, *Alu-E2F3*, *PKD1P2* a *Alu-Sc* u páru dvojčat a nepříbuzné osoby jsou uvedeny v souhrnné tabulce č. 7. Pozorovaný rozdíl 0,5 °C v T_m u úseku *PKD1P2* a *Alu-Sc* mezi dvojčaty je zobrazen derivací křivky tání daných amplikonů na obrázku č. 17 a 18.

Obrázek č. 17 – Derivace křivky tání úseku PKD1P2 amplifikovaného na templátu bisulfítované DNA obou dvojčat.



Obrázek č. 18 – Derivace křivky tání úseku Alu-Sc amplifikovaného na templátu bisulfítované DNA obou dvojčat.



Pomocí párového t-testu bylo zjištěno, že teploty tání jednotlivých úseků se mezi dvojčaty ani mezi dvojčaty a nepříbuznou osobou statisticky významně neliší (p-hodnota byla u každého souboru hodnot vyšší než 0,05). Pomocí jednovýběrového t-testu bylo zjištěno, že u dvojčat ani u nepříbuzné osoby nedošlo u jednotlivých úseků v průběhu třiceti týdnů ke statisticky významným změnám v teplotě tání (p-hodnota byla u každého souboru hodnot vyšší než 0,05).

Tabulka č. 7 - Změny v teplotě tání [°C] zaznamenané v období 30 týdnů u úseku Alu-Sx, Alu-Sp, Alu-E2F3, PKD1P2 a Alu-Sc u páru monozygotních dvojčat a jedné osoby nepřibuzné páru dvojčat.

Týden	Alu-Sx			Alu-Sp			Alu-E2F3			PKD1P2			Alu-Sc		
	Dvojče 1	Dvojče 2	Nepřibuzný	Dvojče 1	Dvojče 2	Nepřibuzný	Dvojče 1	Dvojče 2	Nepřibuzný	Dvojče 1	Dvojče 2	Nepřibuzný	Dvojče 1	Dvojče 2	Nepřibuzný
1	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	80,0	79,5	79,5	76,5	76,5	76,5
2	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	80,0	80,0	79,5	76,5	76,5	76,5
3	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	79,5	80,0	79,5	76,5	76,5	76,5
4	82,0	82,0	81,5	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	79,5	79,5	79,0	76,5	76,5	76,5
5	82,0	81,5	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	80,0	79,5	79,5	76,5	76,5	76,5
6	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	79,5	80,0	79,5	76,5	76,0	76,5
7	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	79,5	80,0	79,5	76,5	76,5	76,5
8	82,0	82,0	81,5	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	79,5	79,5	79,5	76,5	76,5	76,5
9	82,5	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	79,5	79,5	79,5	76,0	76,5	76,5
10	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	80,0	79,5	79,5	76,5	76,5	76,5
11	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	79,5	79,5	79,5	76,5	76,5	76,5
12	82,0	82,0	81,5	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	79,5	79,5	79,0	76,5	76,5	76,5
13	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	80,0	79,5	79,5	76,5	76,5	76,0
14	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	79,5	80,0	79,5	76,5	76,5	76,5
15	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	80,0	79,5	79,5	76,5	76,5	76,5
16	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	80,0	79,5	79,5	76,5	76,0	76,5
17	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	80,0	80,0	79,5	76,5	76,5	76,0
18	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	79,5	80,0	79,5	76,5	76,5	76,5
19	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	79,5	79,5	79,5	76,5	76,5	76,5
20	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	80,0	79,5	79,5	76,5	76,0	76,5
21	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	80,0	80,0	79,5	76,5	76,5	76,5
22	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	80,0	80,0	79,5	76,5	76,5	76,5
23	81,5	82,0	81,5	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	79,5	79,5	79,5	76,5	76,5	76,0
24	82,5	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	80,0	79,5	79,5	76,5	76,0	76,5
25	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	80,0	80,0	79,5	76,5	76,5	76,5
26	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	79,5	80,0	79,5	76,5	76,5	76,5
27	82,0	82,0	81,5	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	79,5	79,5	79,0	76,0	76,5	76,0
28	82,0	81,5	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	80,0	79,5	79,5	76,5	76,0	76,5
29	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	80,0	80,0	79,5	76,5	76,5	76,5
30	82,0	82,0	82,0	74,5	74,5	74,5	74,0	74,0	74,0	79,5	80,0	79,5	76,5	76,5	76,5

Epigenetický stav byl zjištěn u úseků *Alu-Sx*, *Alu-Sp*, *Alu-E2F3*, *PKD1P2* a *Alu-Sc* také v rámci náhodného výběru patnácti osob nepříbuzných páru dvojčat. Teploty tání zjištěné u jednotlivých úseků se pohybovaly v rozmezí stejných hodnot, jaké byly pozorovány v rámci časosběrného pokusu. U testovaných nepříbuzných osob také nebyl u úseků *Alu-Sp* a *Alu-E2F3* pozorován žádný rozdíl v T_m daných ampliconů. U úseku *Alu-Sx* byla u jedenácti osob zaznamenána T_m v hodnotě 82,0 °C a u čtyř osob v hodnotě 81,5 °C. U úseku *PKD1P2* byla čtyřikrát zaznamenána T_m 79,5 °C, desetkrát 80,0 °C a jednou 80,5 °C. U úseku *Alu-Sc* byla čtyřikrát zaznamenána T_m 76,0 °C a jedenáctkrát 76,5 °C. Zjištěné hodnoty T_m u souboru nepříbuzných osob jsou shrnuty v tabulce č. 8.

Tabulka č. 8 – Teploty tání [°C] zaznamenané u úseků Alu-Sx, Alu-Sp, Alu-E2F3, PKD1P2 a Alu-Sc amplifikovaných na templátu bisulfitované DNA 15 osob nepříbuzných páru dvojčat.

Osoba	<i>Alu-Sx</i>	<i>Alu-Sp</i>	<i>Alu-E2F3</i>	PKD1P2	<i>Alu-Sc</i>
1	82,0	74,5	74,0	80,0	76,0
2	82,0	74,5	74,0	80,0	76,5
3	82,0	74,5	74,0	80,5	76,5
4	82,0	74,5	74,0	79,5	76,5
5	82,0	74,5	74,0	80,0	76,0
6	82,0	74,5	74,0	80,0	76,5
7	81,5	74,5	74,0	80,0	76,5
8	82,0	74,5	74,0	79,5	76,5
9	82,0	74,5	74,0	80,0	76,5
10	82,0	74,5	74,0	80,0	76,5
11	81,5	74,5	74,0	80,0	76,5
12	81,5	74,5	74,0	79,5	76,0
13	82,0	74,5	74,0	80,0	76,0
14	82,0	74,5	74,0	80,0	76,5
15	81,5	74,5	74,0	79,5	76,5

Pomocí jednovýběrového t-testu bylo zjištěno, že teploty tání u jednotlivých úseků se v rámci souboru testovaných nepříbuzných osob statisticky neliší (p-hodnota byla u každého souboru hodnot vyšší než 0,05).

6 Diskuze

V rámci praktické části předložené diplomové práce byl sledován epigenetický stav jednoho páru monozygotních dvojčat a jedné osoby nepříbuzné páru dvojčat v časovém období třiceti týdnů. Bylo také provedeno porovnání epigenetického stavu dvojčat s náhodně vybranými patnácti nepříbuznými osobami. Na základě dostupné literatury bylo ke sledování epigenetického stavu vybráno sedm úseků lidského genomu, u kterých byl mezi zdravými monozygotními dvojčaty zaznamenán rozdíl ve stupni methylace. V pěti případech se jednalo o mobilní genetické elementy – LINE-1 (Xu *et al.*, 2015), *Alu-Sp*, *Alu-Sx*, *Alu-E2F3*, *Alu-Sc* (Fraga *et al.*, 2005) a ve dvou případech o unikátní genové sekvence – *PKD1P2*, *GUK1* (Fraga *et al.*, 2005). Detekce methylace u vybraných úseků byla provedena pomocí vysokorozlišovací analýzy křivek tání (*high resolution melting*, HRM).

Po experimentálním ověření specifity primerových sekvencí převzatých z literatury byly z další analýzy vyřazeny primery amplifikující úsek LINE-1 a *GUK1*. S použitím těchto primerů byl z průběhu křivky tání daných amplikonů patrný vznik nespecifických produktů, které by znemožnily jasnou analýzu výsledků. V experimentální části tak byl sledován epigenetický stav u pěti úseků – *Alu-Sp*, *Alu-Sx*, *Alu-E2F3*, *PKD1P2* a *Alu-Sc*.

Úseky *Alu-Sx*, *Alu-Sp*, *Alu-E2F3*, *PKD1P2* a *Alu-Sc* byly nejdříve amplifikovány na templátu methylovaného a nemethylovaného standardu DNA. U úseků *Alu-Sx* a *Alu-Sp* nebyl pozorován žádný rozdíl v teplotě tání mezi amplikony z methylovaného a nemethylovaného standardu. U úseku *Alu-E2F3* a *Alu-Sc* byl zaznamenán rozdíl v teplotě tání amplikonů methylovaného a nemethylovaného standardu pouze 0,5 °C a u úseku *PKD1P2* rozdíl 1,5 °C. U amplikonů methylovaného a nemethylovaného standardu byl však očekáván rozdíl teplot tání nejméně 2 – 3 °C, jako tomu bylo v podobných studiích využívajících detekci methylace pomocí HRM (Tse *et al.*, 2011; Do *et al.*, 2014; Nando *et al.*, 2017). Při amplifikaci bisulfitovaného nemethylovaného templátu totiž dochází ke změně nemethylovaných cytosinů na thyminy, čímž se v amplifikované sekvenci zvýší podíl nukleotidů spojených dvojnou vazbou (thymin s adeninem) namísto nukleotidů spojených vazbou trojnou (cytosin s guaninem). K denaturaci takových amplikonů pak stačí nižší teplota, a tudíž je teplota tání nemethylované sekvence nižší než u sekvence methylované, kde ke konverzi cytosinu na thymin nedochází. Methylovaný a nemethylovaný standard by tak měl představovat horní a spodní hranici rozmezí teplot tání, ve kterých se budou pohybovat

hodnoty teplot tání testovaných vzorků. Možným vysvětlením je použití nevhodných primerových sekvencí, pomocí kterých nebyla zajištěna rovnoměrná amplifikace methylované a nemethylované sekvence. Předějit tomuto problému v budoucnu by bylo možné návrhem nových primerových sekvencí, které by měly splňovat jistá kritéria. Sekvence primeru (v reverse i forward směru) by měla obsahovat jeden nebo dva CpG ostrůvky, které by se měly nacházet co možná nejbližší u 5' konce primeru. Dále by se na 3' konci primeru měl nacházet alespoň jeden thyminový nukleotid. (Wojdacz *et al.*, 2008). K návrhu vhodných primerových sekvencí je možné využít například program BiSearch Primer design (Tusnády *et al.*, 2005), MethPrimer (Li *et al.*, 2002) nebo Primer 3 (Untergasser *et al.*, 2012).

U testovaných vzorků dvojčat a osob nepříbuzných dvojčatům také nebyl zaznamenán významný rozdíl v teplotách tání u daných amplifikovaných úseků. Rozdíl byl očekáván alespoň u úseků *Alu-Sp* a *Alu-E2F3*, protože na základě detekce methylace pomocí HRM u těchto úseků v nedávné studii (Stewart *et al.*, 2015) byl u pěti, respektive u čtyř párů monozygotních dvojčat z celkově pěti testovaných zaznamenán rozdíl v teplotách tání 0,5 – 1,5 °C. Nejvyšší rozdíl (1,5 °C) zaznamenaný ve Stewartově studii byl pozorován u úseku *Alu-Sp* mezi dvěma třiapadesátiletými bratry. Obecně byl zaznamenán výraznější rozdíl mezi sourozenci staršími 40 let než mezi sourozenci ve věku 20 – 25 let (Stewart *et al.*, 2015). Rozdíly v epigenetickém stavu monozygotních dvojčat v souvislosti s přibývajícím věkem byly potvrzeny také dříve, pomocí metod globální detekce methylace (Fraga *et al.*, 2005; Kaminsky *et al.*, 2009; Wong *et al.*, Talens *et al.*, 2012). Vzhledem k faktu, že v předložené diplomové práci byla k analýze použita DNA dvojčat ve věku 22 let, rozdíly v epigenetickém stavu sledovaných úseků u nich nemusí být ještě tak výrazné. U souboru náhodně vybraných nepříbuzných osob (mužů a žen ve věku okolo 30 let) však významný rozdíl také pozorován nebyl.

Možným vysvětlením negativního výsledku jsou nedostatky v postupu protokolu samotného provádění práce. Na základě informací uvedených ve Stewartově studii však není možné dohledat detailní popis provádění analýzy. V této diplomové práci byly pro amplifikaci úseku *Alu-Sp* a *Alu-E2F3* využity stejné primerové sekvence jako ve Stewartově studii. Ve studii není uveden celý průběh PCR protokolu, ale krok analýzy křivek tání byl proveden stejným způsobem. K bisulfitační konverzi autoři využili komerční kit od jiného dodavatele, ale neuvádí, jakým způsobem byla

kontrolována účinnost bisulfitační konverze vzorků. Ve studii také není uvedeno, s jakým nastavením parametrů bylo hodnocení analýzy prováděno.

Je však potřeba také zohlednit, že problémem detekce methylace u mobilních elementů pomocí MS-HRM je jednak povaha samotných elementů, jednak limitace metody MS-HRM. Mobilní elementy se v genomu nacházejí ve statisících kopiích a pokud se jich pouze malá část nachází v hypomethylovaném nebo naopak v hypermethylovaném stavu, není možné tento rozdíl pomocí MS-HRM detekovat. Metoda MS-HRM však byla úspěšně využita ke globální detekci methylace u LINE-1 elementů (Tse *et al.*, 2011). Důležitým předpokladem k úspěšné analýze byl podle autorů návrh specifických primerových sekvencí, pomocí kterých byla amplifikována co nejkratší sekvence s dostatečným počtem CpG ostrůvků. V dalších experimentech by tak měly být primerové sekvence navrhovány i s ohledem na charakteristiku amplifikované sekvence.

Protože se mobilní elementy zdají být perspektivním markerem k epigenetickému rozlišení monozygotních dvojčat (Xu *et al.*, 2015) a metoda MS-HRM představuje rychlou, jednoduchou, citlivou a ekonomicky zajímavou metodu detekce methylace, bylo by přínosné věnovat se optimalizaci metody i nadále.

7 Závěr

V rámci teoretické části předložené diplomové práce byla zpracována literární rešerše pojednávající o jednovaječných a dvojevaječných dvojčatech a o možnostech rozlišení monozygotních dvojčat pomocí genetické metody (celogenomové sekvenování) a pomocí metod negenetických (epigenetické a biometrické metody).

V rámci praktické části diplomové práci byl naplánován a proveden časosběrný pokus sledování epigenetického stavu jednoho páru monozygotních dvojčat. Od dvojčat byly pravidelně jednou týdně odebírány vzorky bukálních stěrů po dobu třiceti týdnů. Ze vzorků byla izolována DNA, která byla následně ošetřena bisulfitační konverzí. Pomocí methylačně specifické vysokorozlišovací analýzy křivek tání byla provedena detekce methylace DNA u pěti úseků lidského genomu – *Alu-Sp*, *Alu-Sx*, *Alu-E2F3*, *PKD1P2* a *Alu-Sc*. Mezi dvojčaty byl pozorován pouze nepatrný rozdíl ve stavu methylace u úseku *Alu-Sx*, *PKD1P2* a *Alu-Sc*. V případě úseků *Alu-E2F3* a *Alu-Sp* nebyl pozorován žádný rozdíl. Stav methylace všech úseků byl u obou dvojčat v rámci třiceti týdnů stabilní. Protože rozlišení monozygotních dvojčat je aktuálním a stále nevyřešeným tématem, bylo by přínosné věnovat se hledání a pozorování genetických i negenetických rozdílů mezi monozygotními dvojčaty i v budoucnu.

8 Použitá literatura

- Ariyaeeinia A., Morrison C., Malegaonkar A., Black S. (2008): A test of the effectiveness of speaker verification for differentiating between identical twins. *Sci Justice* 48(4): 182-86.
- Baschat A.A., Oepkes D. (2014): Twin anemia-polycythemia sequence in monozygotic twins: implications for diagnosis and treatment. *Am J Perinatol* 31 Suppl 1: S25-30.
- Bassil C.F., Huang Z., Murphy S.K. (2013): Bisulfite pyrosequencing. *Methods Mol Biol* 1049: 95-107.
- Batzer M.A., Deininger P.L., Hellmann-Blumberg U., Jurka J., Labuda D., Rubin C.M., Schmid C.W., Zietkiewicz E., Zuckerkandl E. (1996): Standardized nomenclature for Alu repeats. *J Mol Evol* 42: 3-6.
- Beemsterboer S.N., Homburg R., Gorter N.A., Schats R., Hompes P.G.A., Lambalk C.B. (2006): The paradox of declining fertility but increasing twinning rates with advancing maternal age. *Hum Reprod* 21(6): 1531-32.
- Bird A. (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16(1): 6-21.
- Blumenfeld Y.J., Momirova V., Rouse D.J., Caritis S.N., Sciscione A., Peaceman A.M., Reddy U.M., Varner M.W., Malone F.D., Iams J.D., Mercer B.M., Thorp J.M.Jr., Sorokin Y., Carpenter M.W., Lo J., Ramin S.M., Harper M. (2014): Accuracy of sonographic chorionicity classification in twin gestations. *J Ultrasound Med* 33(12): 2187-92.
- Bogdanović O., Veenstra G.J. (2009): DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* 118(5): 549-65.
- Borkar M. (2012): User identification systems leverage smarter biometrics technologies. Online. Dostupné z: <http://www.ti.com/lit/wp/spry222/spry222.pdf>. Citováno [20. 3. 2017].
- Brouha B., Schustak J., Badge R.M., Lutz-Prigge S., Farley A.H., Moran J.V., Kazazian H.H. (2003): Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(9): 5280-85.
- Butler J.M. (2007): Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques* 43(4): ii-v.
- Casa V., Gabellini D. (2012): A repetitive elements perspective in Polycomb epigenetics. *Front Genet* 3: 199.
- Deaton A.M., Bird A. (2011): CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25(10): 1010-22.
- Derom C., Gielen M., Peeters H., Frijns J.P., Zeegers M.P.A. (2011): Time trends in the natural dizygotic twinning rate. *Hum Reprod* 26(8): 2247-52.

- Devlieger R.G., Demeyere T., Deprest J.A., Van Schoubroeck D., Witters I., Timmerman D., Hanssens M. (2001): Ultrasound determination of chorionicity in twin pregnancy: accuracy and operator experience. *Twin Res* 4(4): 223-26.
- Do H., Wong N.C., Murone C., John T., Solomon B., Mitchell P.L., Dobrovic A. (2014): A critical re-assessment of DNA repair gene promoter methylation in non-small cell lung carcinoma. *Sci Rep* 4:4186.
- Drost J.B., Lee W.R. (1995): Biological basis of germline mutation: comparisons of spontaneous germline mutation rates among drosophila, mouse, and human. *Environ Mol Mutagen* 25 Suppl 26: 48-64.
- Erwin J.A., Marchetto M.C., Gage F.H. (2014): Mobile DNA elements in the generation of diversity and complexity in the brain. *Nat Rev Neurosci* 15(8): 497-506.
- Euro-Peristat Project with SCPE and EUROCAT (2013): European Perinatal Health Report. The health and care of pregnant women and babies in Europe in 2010. 252 pp.
- FindLaw (online 2017). State department of social services division of child support enforcement v. Richard Miller, Respondent. FindLaw: Cases and codes. Online. Dostupné z: <http://caselaw.findlaw.com/mo-court-of-appeals/1341418.html>. Citováno [25. 2. 2017].
- Fraga M. F., Ballestar E., Paz M. F., Ropero S., Setien F., Ballestar M. L., Heine-Suñer D., Cigudosa J. C., Urioste M., Benitez J., Boix-Chornet M., Sanchez-Aguilera A., Ling C., Carlsson E., Poulsen P., Vaag A., Stephan Z., Spector T. D., Wu Y. Z., Plass C., Esteller M. (2005): Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(30): 10604-9.
- Frisch L., Groisman G., Hallak M. (2011): First trimester diagnosis of forked cord in monoamniotic twin pregnancy. *Placenta* 32(12): 1057-59.
- Frommer M., McDonald L.E., Millar D.S., Collis C.M., Watt F., Grigg G.W., Molloy P.L., Paul C.L. (1992): A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(5): 1827-32.
- Greaves M.F., Maia A.T., Wiemels J.L., Ford A.M. (2003): Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood* 102(7): 2321-33.
- Groeneveld E., Lambers M.J., Stakelbeek M.E., Mooij T.M., van den Belt-Dusebout A.W., Heymans M.W., Schats R., Hompes P.G., Hoek A., Burger C.W., van Leeuwen F.E., Lambalk C.B. (2012): Factors associated with dizygotic twinning after IVF treatment with double embryo transfer. *Hum Reprod* 27(10): 2966-70.
- Gu H., Bock C., Mikkelsen T.S., Jäger N., Smith Z.D., Tomazou E., Gnirke A., Lander E.S., Meissner A. (2010): Genome-scale DNA methylation mapping of clinical samples at single-nucleotide resolution. *Nat Methods* 7(2): 133-36.
- Hall J.G. (2003): Twinning. *Lancet* 362: 735-43.

- Hankins G.V., Saade G.R. (2005): Factors influencing twins and zygosity. *Paediatr Perinat Epidemiol* 19 Suppl 1: 8-9.
- Hannelius U., Gherman L., Mäkelä V.V., Lindstedt A., Zucchelli M., Lagerberg C., Tybring G., Kere J., Lindgren C.M. (2007): Large-scale zygosity testing using single nucleotide polymorphisms. *Twin Res Hum Genet* 10(4): 604-25.
- Hansen H.E., Simonsen B.T. (2008): A case of heteropaternal superfecundation in a pair of Danish twins. *Forensic Sci Int Genet: Supplementary series* 1(1): 514-15.
- Hoekstra C., Zhao Z.Z., Lambalk C.B., Willemsen G., Martin N.G., Boomsma D.I., Montgomery G.W. (2008): Dizygotic twinning. *Hum Reprod Update* 14(1): 37-47.
- Holland M.M., Parson W. (2011): GeneMarker® HID: A reliable software tool for the analysis of forensic STR data. *J Forensic Sci* 56(1): 29-35.
- Hollingsworth K., Bowyer K.W., Flynn P.J. (2010): Similarity of iris texture between identical twins. *Proceedings of the 2010 IEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition Workshops*. Dostupné z: <http://www.nws-sa.com/biometrics/iris/twins.pdf>. Citováno [4. 4. 2017].
- Holmes E.E., Jung M., Meller S., Leisse A., Sailer V., Zech J., Mengdehl M., Garbe L.A., Uhl B., Kristiansen G., Dietrich D. (2014): Performance evaluation of kits for bisulfite-conversion of DNA from tissue, cell lines, FFPE tissues, aspirates, lavages, effusions, plasma, serum, and urine. *PLoS One* 9(4): e93933.
- Hopkins S. (2015): Marseille identical twins rape case solved after victims reveal speech impediment. *The Huffington Post*. Online. Dostupné z: http://www.huffingtonpost.co.uk/2015/09/08/confession-in-case-of-marseille-identical-twins-held-over-rapes_n_8102272.html. Citováno [25. 2. 2017].
- Hug M., Silke J., Georgiev O., Rusconi S., Schaffner W., Matsuo K. (1996): Transcriptional repression by methylation: cooperativity between a CpG cluster in the promoter and remote CpG-rich regions. *FEBS Lett* 379(3): 251-4.
- Chan K., Sterling J.F., Roberts S.A., Bhagwat A.S., Resnick M.A., Gordenin D.A. (2012): Base damage within single-strand DNA underlies in vivo hypermutability induced by a ubiquitous environmental agent. *PLoS Genet* 8(12): e1003149.
- Chen T., Li E. (2004): Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferase. *Curr Top Dev Biol* 60: 55-89.
- Jain A.K., Bolle R., Pankanti S. (1999): *Biometrics: Personal identification in networked society*. Norwell, Massachusetts: Kluwer Academic Publishers: 411 pp.
- Jain A.K., Prabhakar S., Pankanti S. (2002): On the similarity of identical twin fingerprints. *Pattern Recognit* 35: 2653-63.
- Joy J., McClure N., Cooke I.E. (2008): A comparison of spontaneously conceived twins and twins conceived by artificial reproductive technologies. *J Obstet Gynaecol* 28(6): 580-85.

- Kaminsky Z. A., Tang T., Wang S. C., Ptak C., Oh G. H., Wong A. H., Feldcamp L. A., Virtanen C., Halfvarson J., Tysk C., McRae A. F., Visscher P. M., Montgomery G. W., Gottesman I. I., Martin N. G., Petronis A. (2009): DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat Genet* 41(2): 240-5.
- Kanter J.R., Boulet S.L., Kawwass J.F., Jamieson D.J., Kissin D.M. (2015): Trends and correlates of monozygotic twinning after single embryo transfer. *Obstet Gynecol* 125(1): 111-117.
- Khalek N., Johnson M.P., Bebbington M.W. (2013): Fetoscopic laser therapy for twin-to-twin transfusion syndrome. *Semin Pediatr Surg* 22(1): 18-23.
- Khitrinskaya I.Y., Stepanov V.A., Puzyrev V.P. (2003): Alu repeats in the human genome. *Mol Biol* 37(3): 325-33.
- Kim S., Cho C.S., Han K., Lee J. (2016): Structural variation of Alu element and human disease. *Genomics Inform* 14(3): 70-77.
- Kong A.W.K., Zhang D., Lu G. (2006): A study of identical twins palmprints for personal verification. *Pattern Recognit* 39: 2149-56.
- Köse C., Ikibas C. (2011): A personal identification system using retinal vasculature in retinal fundus images. *Expert Syst Appl* 38: 13670-81.
- Krawczak M., Cooper D.N., Fändrich F., Engel W., Schmidtke J. (2012): How to distinguish genetically between an alleged father and his monozygotic twin: a thought experiment. *Forensic Sci Int Genet* 6(5): e129-30.
- Kücken M., Newell A.C. (2005): Fingerprint formation. *J Theor Biol* 235(1): 71-83.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L. ... Szustakowki J; International Human Genome Sequencing Consortium (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822): 860-921.
- Lauter D. (2013): Double trouble for Marseille police hunting serial rapist as DNA turns up identical twins. *The Telegraph*. Online. Dostupné z: <http://www.telegraph.co.uk/news/worldnews/europe/france/9861164/Double-trouble-for-Marseille-police-hunting-serial-rapist-as-DNA-turns-up-identical-twins.html>. Citováno [25. 2. 2017].
- Leonhardt H., Page A.W., Weier H.U., Bestor T.H. (1992): A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71(5): 865-73.
- Lewi L., Van Schoubroeck D., Gratacos E., Witters I., Timmerman D., Deprest J. (2003): Monozygotic diamniotic twins: complications and management options. *Curr Opin Obstet Gynecol* 15(2): 177-94.
- Lewi L., Cannie M., Blickstein I., Jani J., Huber A., Hecher K., Dymarkowski S., Gratacos E., Lewi P., Deprest J. (2007): Placental sharing, birthweight

- discordance, and vascular anastomoses in monochorionic diamniotic twin placentas. *Am J Obstet Gynecol* 197(6): 587.e1-8.
- Li E., Zhang Y. (2014): DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(5): a019133.
- Lister R., Ecker J.R. (2009): Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Res* 19(6): 959-66.
- Lu H.L., Wang C.X., Wu F.Q., Li J.J. (1994): Paternity identification in twins with different fathers. *J Forensic Sci* 39(4): 1100-102.
- Martin J.A., Hamilton B.E., Osterman M.J.K., Driscoll A.K., Mathews T.J. (2017): Births: Final data for 2015. *National vital statistics report* 66(1): 70 pp.
- Mbarek H., Steinberg S., Nyholt D.R., Gordon S.D., Miller M.B., McRae A.F., Hottenga J.J., Day F.R., Willemsen G., de Geus E.J., Davies G.E., Martin H.C., Penninx B.W., Jansen R., McAloney K., Vink J.M., Kaprio J., Plomin R., Spector T.D., Magnusson P.K., Reversade B., Harris R.A., Aagaard K., Kristjansson R.P., Olafsson I., Eyjolfsson G.I., Sigurdardottir O., Iacono W.G., Lambalk C.B., Montgomery G.W., McGue M., Ong K.K., Perry J.R., Martin N.G., Stefansson H., Stefansson K., Boomsma D.I. (2016): Identification of common genetic variants influencing spontaneous dizygotic twinning and female fertility. *Am J Genet* 98(5): 898-908.
- Nando Y., Watari J., Ito C., Hara K., Yamasaki T., Okugawa T., Kondo T., Kono T., Tozawa K., Tomita T., Ohda Y., Oshima T., Fukui H., Matsubara N., Tomita N., Hirota S., Miwa H. (2017): Genetic instability, CpG island methylator phenotype, and proliferative activity are distinct differences between diminutive and small tubular adenoma of the colorectum. *Hum Pathol* 60:37-45.
- Okano M., Bell D.W., Haber D.A., Li E. (1999): DNA methyltransferase Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99(3): 247-57.
- Patterson K., Molloy L., Qu W., Clark S. (2011): DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *J Vis Exp* 56: e3170.
- Saxonov S., Berg P., Brutlag D.L. (2006): A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(5): 1412-7.
- Slotkin R.K., Martienssen R. (2007): Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Gen* 8: 272-85.
- Stewart L., Evans N., Bexon K. J., van der Meer D. J., Williams G. A. (2015): Differentiating between monozygotic twins through DNA methylation-specific high-resolution melt curve analysis. *Anal Biochem* 476: 36-9.
- Talens R.P., Christensen K., Putter H., Willemsen G., Christiansen L., Kremer D., Suchiman H.E., Slagboom P.E., Boomsma D.I., Heijmans B.T. (2012): Epigenetic

- variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell* 11(4): 694-703.
- Tanaka K., Okamoto A. (2007): Degradation of DNA by bisulfite treatment. *Bioorg Med Chem Lett* 17(7): 1912-12.
- Tao X., Chen X., Yang X., Tian J. (2012): Fingerprint recognition with identical twin fingerprints. *PLoS One* 7(4): e35704.
- Tarsa M., Moore T.R. (2015): Multifetal gestation and malpresentation. Online. Dostupné z: <http://clinicalgate.com/multifetal-gestation-and-malpresentation/>. Citováno [26. 2. 2017].
- Townsend G. C., Richards L., Hughes T., Pinkerton S., Schwerdt W. (2005): Epigenetic influences may explain dental differences in monozygotic twin pairs. *Aust Dent J* 50(2): 95-100.
- Tse M.Y., Ashbury J.E., Zwingerman N., King W.D., Taylor S.A., Pang S.C. (2011): A refined, rapid and reproducible high resolution melt (HRM)-based method suitable for quantification of global LINE-1 repetitive element methylation. *BMC Res Notes* 4:565.
- Turner M.A., Yang X., Yin D., Kuczera K., Borchardt R.T., Howell P.L. (2000): Structure and function of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Cell Biochem Biophys* 33(2): 101-25.
- Tusnády G.E., Simon I., Váradi A., Arányi T. (2005): BiSearch: primer-design and search tool for PCR on bisulfite-treated genomes. *Nucleic Acids Res* 33(1): e9.
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. (2012): *Nucleic Acids Res* 40(15): e115.
- Van Dongen J., Ehli E. A., Slieker R. C., Bartels M., Weber Z. M., Davies G. E., Slagboom P. E., Heijmans B. T., Boomsma D. I. (2014): Epigenetic variation in monozygotic twins: a genome-wide analysis of DNA methylation in buccal cells. *Genes* 5(2): 347-65.
- Vidaki A., Daniel B., Court D. S. (2013): Forensic DNA methylation profiling-potential opportunities and challenges. *Forensic Sci Int Genet* 7(5): 499-507.
- Vitthala S., Gelbaya T.A., Brison D.R., Fitzgerald C.T., Nardo L.G. (2009): The risk of monozygotic twins after assisted reproductive technology: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 15(1): 45-55.
- Wang Z., Zhu R., Zhang S., Bian Y., Lu D., Li C. (2015): Differentiating between monozygotic twins through next-generation mitochondrial genome sequencing. *Anal Biochem* 490: 1-6.
- Weber-Lehmann J., Schilling E., Gradl G., Richter D. C., Wiehler J., Rolf B. (2014): Finding the needle in the haystack: differentiating "identical" twins in paternity testing and forensic by ultra-deep next generation sequencing. *Forensic Sci Int Genet* 9: 42-6. Electronic 2013.

- Wicker T., Sabot F., Hua-Van A., Bennetzen J.L., Capy P., Chalhoub B., Flavell A., Leroy P., Morgante M., Panaud O., Paux E., SanMiguel P., Schulman A.H. (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet* 8(12): 973-82.
- Wittwer C.T., Reed G.H., Gundry C.N., Vandersteen J.G., Pryor R.J. (2003): High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 49(6): 853-60.
- Wojdacz T. K., Dobrovic A. (2007): Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res* 35(6): e41.
- Wojdacz T.K., Dobrovic A., Hansen L.L. (2008): Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protoc* 3(12): 1903-8.
- Xu J., Fu G., Yan L., Craig J. M., Zhang X., Fu L., Ma C., Li S., Cong B. (2015): LINE-1 DNA methylation: A potential forensic marker for discriminating monozygotic twins. *Forensic Sci Int Genet* 9: 136-45.
- Yang M.J., Tzeng C.H., Tseng J.Y., Huang C.Y. (2006): Determination of twin zygosity using a commercially available STR analysis of 15 unlinked loci and the gender-determining marker amelogenin – a preliminary report. *Hum Reprod* 21(8): 2175-79.
- Zhong J., Agha G., Baccarelli A.A. (2016): The role of DNA methylation in cardiovascular risk and disease: Methodological Aspects, study design, and data analysis for epidemiological studies. *Circ Res* 118(1): 119-31.

9 Seznam použitých zkratk

5-mC	5-methylcytosin
A	adenin
ART	metody asistované reprodukce
ATP	adenosintrifosfát
BC	bisulfitační konverze
C	cytosin
DEPC	diethyl pyrokarbonát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNMT	DNA methyltransferáza
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
DZ	dizygotní
G	guanin
HLA	lidský leukocytární antigen
IVF	fertilizace <i>in vitro</i>
LINEs	dlouhé rozptýlené jaderné elementy
MGEs	mobilní genetické elementy
MS-HRM	methylačně specifická vysokorozlišovací analýza křivek tání
MZ	monozygotní
PCR	polymerázová řetězová reakce
SAH	S-adenosyl-L-homocystein
SAM	S-adenosyl-L-methionin
SINEs	krátké rozptýlené jaderné elementy
SNPs	jednonukleotidové (bodové) polymorfismy
STRs	krátké tandemové repetice
T	thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T _m	teplota tání
U	uracil