

Forezná analýza metylácie DNA

Anotácia: Predkladaný príspevok je venovaný v súčasnosti rýchlo sa rozvíjajúcej problematike možnosti využitia analýzy metylácie DNA vo foreznej oblasti. Takisto poskytuje prehľad možností využitia doteraz získaných metód a poznatkov o identifikačnom potenciáli analýzy metylácie DNA. Autorka v príspevku prezentuje charakteristiku metylačného procesu a jeho klasifikáciu v rámci epigenetických zmien, ako aj porovnanie analýzy metylácie DNA s konvenčnými metódami jej analýzy s dôrazom na jedinečnosť tohto typu analýzy. V príspevku sú uvedené oblasti, v ktorých sa využíva analýza metylácie DNA, medzi ktoré patrí rozlíšenie jednovaječných dvojčiat, určenie typu tkaniva, z ktorého vzorka pochádza či určenie závislosti na nikotíne u pôvodcu vzorky. Zároveň autorka načrtáva aj oblasti, v ktorých sa metylácia DNA len začína využívať, perspektíva jej využitia vo foreznej praxi je však nepopierateľná.

Kľúčové slová: DNA, metylácia DNA, epigenetické zmeny, analýza metylácie DNA, forezné využitie metylácie DNA

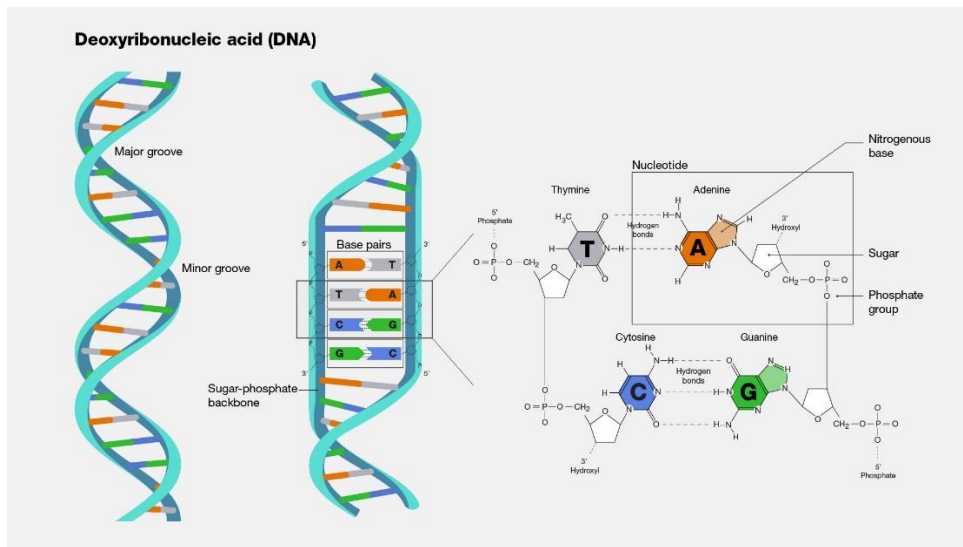
Úvod

Deoxyribonukleová kyselina je nositeľkou genetickej informácie a pre každého je jedinečná. Práve táto jej schopnosť stimulovala jej využitie i vo foreznej oblasti. DNA je charakteristická pre každého jedinca a jedinú výnimku tvoria monozygotné dvojčatá, ktorých DNA je totožná. Analýza DNA bezpochybné patrí medzi najčastejšie využívanie analýzy v rámci vyšetrovania trestných činov. Aj DNA stopy sú druhom, ktorý je frekventovane zaisťovaný kriminalistickým technikom v rámci obhliadky miesta činu. DNA stopa zaistená na mieste činu, ktorá sa neskôr analyzuje, plní dôležitú úlohu v rámci policajného vyšetrovania. Výsledky analýzy sa prijímajú ako hodnoverný dôkaz, ktorý má veľkú dôkaznú hodnotu, čo potvrdzuje i akceptácia výsledkov analýzy DNA súdmi. Jej potenciál však doteraz nebol kompletne využitý. V prípade, že je množstvo DNA vo vzorke príliš nízke, DNA je degradovaná alebo ak tradičné profilovanie STR má obmedzenú hodnotu, je možné uvedenú vzorku analyzovať z hľadiska epigenetických zmien, medzi ktoré patrí metylácia DNA. V súčasnosti ani laik nepochybuje o tom, že za naše vlastnosti a znaky zodpovedajú naše gény. Každý z nás už v živote aspoň raz povedal, že „má niečo v génoch“, pričom práve prejav génov závisí od viacerých faktorov, akými sú napríklad životný štýl, výživa, vplyv stresu, požívanie alkoholických nápojov či užívanie omamných a psychotropných látok. Uvedomujúc si vyššie uvedený fakt, na analýzu metylácie DNA sa v poslednom čase vyvinul niekoľko metód, ktoré sa odlišujú napríklad rozdielnou citlivosťou, spôsobom využitia či nákladnosťou. Pomocou týchto metód je možné analyzovať metylačné vzorce zaistenej vzorky. Z výsledkov foreznej analýzy metylácie DNA je možné zisťovať také ukazovatele, akými je vek osoby, či je osoba fajčiarom, o aké tkanivo, prípadne o akú telesnú tekutinu ide. Je možné rozlíšiť aj monozygotné dvojčatá, čím sa napomáha pri identifikácii neznámeho pôvodcu vzorky. Napriek tomu, že niektoré druhy analýzy metylácie DNA sú len vo svojich počiatkoch, je viac než zrejmé, že analýza metylácie DNA má veľký forezný potenciál a v budúcnosti bude môcť konkurovať doposiaľ zaužívaným forezným metódam, a tým pomôcť pri vyšetrovaní trestných činov.

Úvod do problematiky

Deoxyribonukleová kyselina je nositeľkou genetickej informácie organizmov, okrem tých, ktorých funkciu plní ribonukleová kyselina (RNA). DNA pozostáva z dvoch polynukleotidových reťazcov, ktoré sú dlhé a skrútené do dvojitej špirály. Tieto vlákna sa nazývajú aj reťazce DNA. Špirálu tvorí sekvencia nukleotidov, ktoré sú spojené chemickou väzbou. Nukleotidy sú zložené z deoxyribózy, fosfátu a dusíkatej bázy. Deoxyribóza a fosfát tvoria takzvanú kostru DNA. Dusíkaté bázy sa vyskytujú v DNA v rôznych kombináciách a sú

celkovo 4. Patria sem adenín, guanín, cytozín a tymín. Posledné dve spomínané bázy sa vyskytujú spolu ako pyrimidínové bázy a prvé dve pomenované ako purínové bázy. Molekulu DNA delíme na sekcie, ktorými sú gény obsahujúce veľmi dôležité informácie. DNA je pre každého jedinca iná, čo z nej robí jedinečný znak vhodný na identifikáciu.¹



Obrázok 1 Deoxyribonukleová kyselina(DNA)²

Epigenetika je progresívne rozvíjajúcim sa odborom patriacim pod genetiku, ktorý je zameraný na štúdium mechanizmov zodpovedných za reguláciu expresie, a teda prejavu génov. Epigenetické mechanizmy rozhodujú o tom, kde a kedy sa konkrétny gén prejaví, a teda či sa bude aktivovať alebo jeho prejav bude inaktívovaný. Týmto spôsobom korigujú výkon génov. Epigenetika sa zaoberá štúdiom procesov a mechanizmov, ktoré gény stimulujú alebo ich vyradujú z činnosti. O tom, či sa gény prejavia, nerozhoduje poradie nukleotidov, ale epigenetické mechanizmy a externé vplyvy, ktoré sú spúšťačom epigenetických procesov.

Epigenetické mechanizmy sa delia na 4 druhy, a to:

- chemické modifikácie histónov,
- činnosť malých nekódujúcich molekúl RNA,
- zmeny v usporiadaní chromatinu
- a metylácia DNA.³

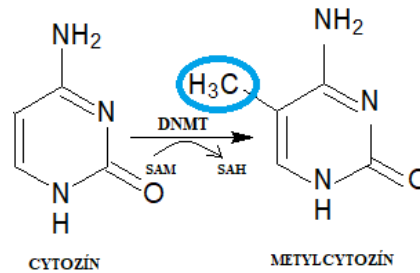
Metylácia DNA je epigenetická modifikácia DNA, pri ktorej dochádza ku kovalentnému prenosu metylovej skupiny (-CH₃) na piaty uhlíkový atóm, v mieste cytozín-fosfát-guanín (CpG) pyrimidinového kruhu cytozínu pomocou enzýmu z rodiny DNA methyltransferáz- DNMT. Tým vznikne zlúčenina 5- metylcytozín. DNMT získavajú metylovú skupinu pre prenos z S-adenosylmethioninu- SAM. SAM je kofaktorom pre mnohé enzýmy. Je to bežný substrát pre metylačné reakcie, a teda pre prenos metylovej skupiny. Tento proces plní významnú úlohu pri

¹ NIH, 2022. *Genetics*. In: *National institute of General Medical Sciences*. [online]. [cit. 27.01.2023] Dostupné na internete: <https://nih.gov/education/fact-sheet/Pages/genetics.aspx>.

² NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE, 2023. *Deoxyribonucleic acid (DNA)*. In: *National Human Genome Research Institute*. [online]. [cit. 22.05.2023] Dostupné na internete: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Deoxyribonucleic-Acid>.

³ JIN B., LI Y. a K.D. ROBERTSON, 2011. *DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy?* In: *Genes & Cancer*, s. 607-617.

regulácii génovej expície a pri bunkovej diferenciácii, a to tým, že vplýva na väzbové miesta transkripčného faktora a na štruktúru chromatinu. Výrazný vplyv na úroveň metylácie má aj chronologický vek, keďže z celkového počtu 28 miliónov CpG dinukleotidov sa vekom menia milióny z nich.⁴



Obrázok 2 metylácia⁵ DNA

V ľudských bunkách zohráva metylácia, no i demetylácia DNA nezastupiteľnú úlohu pri inaktivácii alebo aktivácii špecifických génov, ktoré sú potrebné v danom čase pre bunku, pri bunkovej diferenciácii v tkanivách alebo i počas vývoja organizmu. Rôzne vonkajšie faktory sú spôsobilé ovplyvniť miesta, kde metylové skupiny na DNA nasadnú, teda i gény, ktorých prejav zablokujú. Metylácia môže viesť k odlišnosti jedincov s identickou genetickou výbavou, pričom vhodným príkladom je včelia kráľovná a robotnica, ktorých gény sú identické, avšak odlišujú sa od seba rozdielnou metyláciou génov. Tieto rozdiely sú spôsobené rozdielnou výživou včiel, nakoľko potrava je jedným z faktorov, ktoré môžu naštartovať metyláciu DNA, a tak ovplyvniť vzhľad hmyzu. Zmena výživy môže spôsobiť aj aktiváciu dočasne nefunkčných génov, a teda gény môžu demetylovať, čo sa prejavuje napríklad pravidelným pitím menšieho množstva červeného vína, kedy je vďaka resveratloru a jeho prítomnosti umožnená aktivácia génov, ktoré sa podieľajú na antioxidačných procesoch.

Tak ako genetické, aj epigenetické procesy sú navzájom prepojené, nakoľko za naše vlastnosti a znaky zodpovedajú gény, ktorých prejav je závislý od rôznych vplyvov či faktorov prostredia. Medzi tieto vplyvy patria výživa, stres či životný štýl. Uvedené faktory sú spúšťačmi epigenetických procesov, čím sprostredkovane rozhodujú o tom, či sa jednotlivé gény budú utlmovať alebo aktivovať. Vplyv výživy na funkciu epigenetických procesov potvrdili svojimi výsledkami zo skúmania i vedci z Duke University v Spojených štátoch amerických experimentmi na myšiach. Počas experimentov sa používal špeciálny druh myší, ktorý bol náchylný na rakovinu a cukrovku. Myši boli sa od tých obyčajných líšili farbou. Boli sfarbené do žltá a boli obézne a mohutné. Strava myší bola výskumníkmi schválne obohatená o kyselinu listovú Genisteín, cholín a o vitamín B12, teda o látky, ktoré môžu slúžiť ako zdroj metylových donorov - skupín pre činnosť epigenetických mechanizmov. Metylácia génu *agouti*, ktorý je zodpovedný za žlté sfarbenie rodičovskej obéznej myši, bola príčinou toho, že mláďatá boli hnedé, malé, zdravé a štíhle. Zmenená výživa, ktorá je bezpochybné faktorom prostredia, ako aj u včiel, spôsobuje epigeneticky podmienenú zmenu aktivity génov, v tomto prípade génu *agouti*, ktorý je zodpovedný za všetky pozorované zmeny. Prekvapivá bola skutočnosť, že tieto zmeny sa prenášali i na nasledujúce generácie, z čoho vyplýva, že existujú chemické procesy a mechanizmy, pri ktorých jednoduchá zložka výživy alebo vystavenie organizmov vplyvom vonkajších podmienok, napríklad stresu, zosilňujú alebo tlmia účinok génov. Do úvahy prichádza tvrdenie, že funkčnosť niektorých génov možno nepriamo epigeneticky ovplyvňovať v negatívnom alebo pozitívnom zmysle. Epigenetický profil sa v priebehu života

⁴ EGGER G., LIANG G., APARICIO A. a kol., 2004. *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. In: *Nature*, n. 429, s. 457-461.

⁵ Obrázok z vlastného zdroja.

organizmov prispôsobuje a mení, DNA je spôsobilá na príjem a akceptáciu množstva nových informácií či stimulov z prostredia a prostredníctvom epigenetických procesov a mechanizmov ich využiť za účelom funkčnej zmeny génu.

Nielen výživa, ale aj negatívne zážitky, užívanie drog, vážne stresové situácie či zanedbávanie detí umožňujú prostredníctvom vyvolaných biochemických epigenetických zmien rozkázať génom to, ako silno alebo či vôbec sa majú prejavíť. Na podklade novozískaných poznatkov sa epigenetika opiera o traumatické zážitky osoby a jej predkov, ktoré zanechávali molekulárne jazvy, resp. značky na DNA ďalších generácií. Obrazne povedané, zážitky predkov si vďaka epigenetike nesieme so sebou. Taktiež i vedecké štúdie poukázali na skutočnosť, že nepriaznivé skúsenosti a životné podmienky zanechávajú v človeku dlhotrvajúce epigenetické stopy a prostredníctvom zmien v metylácii DNA a modifikácii histónov môžu dokonca vyvolať i depresie. Vedecky je dokázané i to, že nielen samotná depresia, ale aj jej liečba antidepresívami súvisia s dynamickými zmenami vyvolanými pôsobením epigenetických mechanizmov, predovšetkým metyláciou DNA.

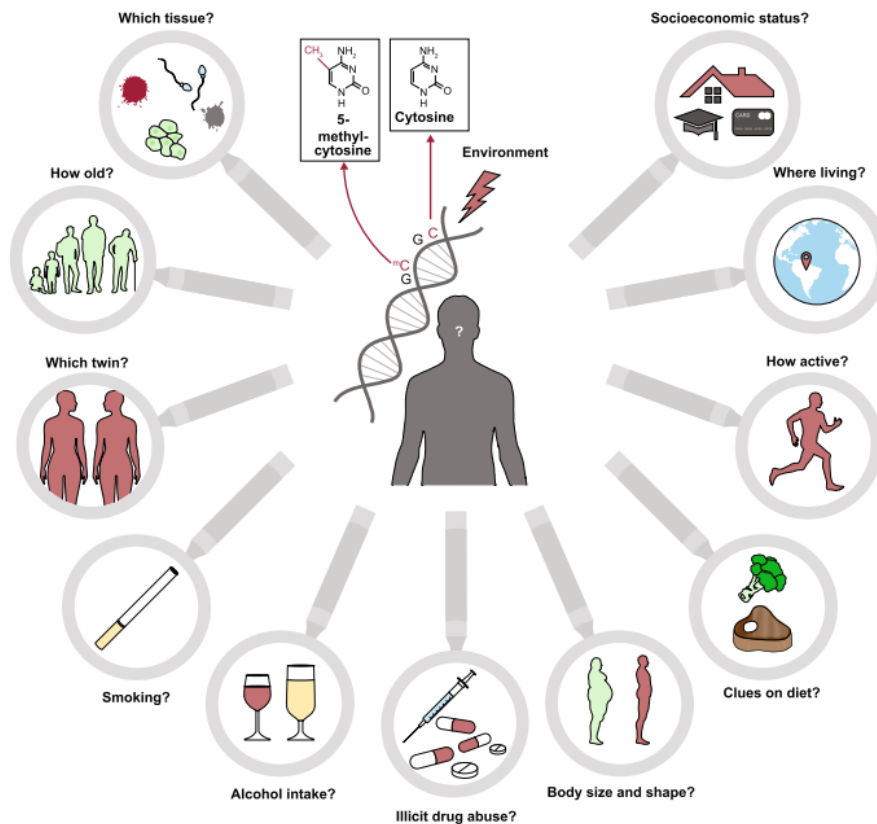
Niektoré štúdie zamerané na epigenetiku naopak odhalili, že láskavé zaobchádzanie matky s dieťaťom vo veľkej miere ovplyvňuje jeho epigenetické predispozície v psychickej oblasti. Pri porovnávaní matkou zanedbávaných a zanedbávaných myší boli zistené výrazné epigeneticky podmienené rozdiely v psychickej vyrovnanosti, inteligencii a schopnostiach. Odborník v oblasti epigenetiky profesor Moshe Szyf experimentálne dokázal, že materská starostlivosť mení v mozgu myšacieho potomka nastavenie génov, čo sa v dospelosti môže prejavíť napríklad ovplyvnením hladiny stresového hormónu kortizolu v krvi. Profesor Szyf zistil, že zvýšenie hladiny stresových hormónov glukokortikoidov v krvi mláďat potkanov, o ktoré sa matka málo starala, spôsobila nedostatočnú metyláciu génu pre glukokortikoidový receptor, ktorý riadi hladinu týchto stresových hormónov v krvi. Pre takéto zanedbávané mláďatá sú charakteristické zvýšené reakcie na stres.⁶

Využitie analýzy metylácie DNA vo forenznej vede

Ak sa nenájde žiadna zhoda profilu, napríklad kvôli tomu, že množstvo DNA vo vzorke je príliš nízke alebo DNA je príliš degradovaná na analýzu, tradičné profilovanie STR môže mať obmedzenú hodnotu. Zavádzanie nových techník a technológií do kriminalistickej forenznej praxe je pomalé, no vyvíjajú sa nové metodológie, ktoré umožňujú analýzu týchto náročných vzoriek a ktoré môžu generovať rôzne informácie o pôvodcovi biologickej vzorky. Okrem informácií zakódovaných v sekvencii báz DNA v genóme nesie molekula DNA ďalšiu vrstvu informácií vo forme chemických modifikácií nukleotidov a proteínov súvisiacich s chromatínom. Široko definované ako epigenetické zmeny, tieto modifikácie menia vzorce génovej expresie prostredníctvom rôznych mechanizmov a ukázalo sa, že majú úlohu v regulácii kľúčových bunkových procesov, pričom epigenetické chyby sú spojené s chorobami, ako je rakovina. Výskum v oblasti metylácie DNA sa zamerá na odhad veku pôvodcu vzorky DNA a identifikáciu typu tkaniva pre telesné tekutiny a iné forenzne relevantné biologické vzorky, hoci analýza metylácie DNA má celý rad ďalších využití dôležitých pre foreznú oblasť vrátane rozlišovania jednovaječných dvojčiat, určovania či pôvodca DNA je fajčiarom a iné využitia. Metylácia DNA hrá kľúčovú úlohu v diferenciacii buniek, takže miesta CpG sú rozdielne metylované v rôznych tkanivách. Táto tkanivová špecifickosť bola úspešne využitá na vývoj testov založených na metylácii pomocou rôznych technológií. V mnohých štúdiách boli opísané epigenetické markery na identifikáciu forenzne relevantných typov tkanív vrátane krvi, spermy, slín, vaginálneho materiálu a menštruačnej krvi. Kľúčovou výhodou identifikácie

⁶ VND, 2018. *Čo je epigenetika a aký je vzťah medzi genetikou a epigenetikou*. In: *Veda na dosah*. [online]. [cit. 27.01.2023] Dostupné na internete: <https://vedanadosah.cvtisr.sk/priroda/biologia/co-je-epigenetika-a-aky-je-vztah-medzi-genetikou-a-epigenetikou/>.

typu tkaniva z analýzy DNA skôr ako RNA je to, že to môže poskytnúť spojenie medzi profilom STR a zodpovedajúcim typom tkaniva, keďže oba typy informácií pochádzajú z rovnakej molekuly.⁷



Obrázok 3 Možnosti forenzného epigenetického profilovania jedinca⁸

Určovanie veku osoby

Stanovenie veku obetí alebo podozrivých je dôležitou súčasťou vyšetrovania trestných činov. Súčasný prístup určovania veku je založený na hodnotení štruktúry a zloženia kostí a zubov. Využívajú sa aj chemické metódy, ktoré zahŕňujú racemizáciu kyseliny asparágovej, akumuláciu olova, sieťovanie kolagénu, chemické zloženie zubov a glukozylácia proteínov.⁹

Existujú aj genetické metódy, ktorých výhodou je, že sú aplikovateľné takmer na každé tkanivo, ktoré obsahuje DNA. Jedným z prvých skúmaných genetických markerov je mitochondriálna DNA (mtDNA). Akumulácia mutácií v mtDNA je však medzi jednotlivcami aj medzi tkanivami jedného jedinca veľmi odlišná, čo vedie k tomu, že jej využitie je len hrubým ukazovateľom a umožňuje len delenie vzoriek podľa vekových skupín, no nedosahuje takú presnosť, aká sa vo forenznnej oblasti vyžaduje. Ďalší spôsob bol založený na sledovaní skracovania telomér, v štúdiách sa však zaznamenala veľká chybovosť spôsobená dĺžkou telomér aj u osôb rovnakého veku. Je to v dôsledku toho, že dĺžka telomér je ovplyvňovaná aj dedičnosťou, chorobami či životným štýlom, preto nie je presná a skôr sa využíva v medicíne než vo forenzných vedách. Okrem toho sú známe aj iné metódy určovania veku, no žiadne nedosahujú takú presnosť,

⁷ OHGANE, J., YAGI, S. a K. SHIOTA, 2008. *Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells*. In: *Placenta*, s. 29-35.

⁸ VIDAČI A. a M. KAYSER, 2017. *From forensic epigenetics to forensic epigenomics: broadening DNA investigative intelligence*. In: *Genome Biology*, s. 238.

⁹ BEKAERT, B., KAMALANDUA, A., ZAPICO, S.C. a kol., 2015. *Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers*. In: *Epigenetics*, s. 922-930.

ktorá by mala využitie vo forenzných vedách, a preto je najvhodnejšou technikou predikcie veku jeho určovanie na základe zmien hladiny metylácie DNA. Na určenie biologického veku sú potrebné spoľahlivé biomarkery starnutia, pričom na ich identifikácii sa pracuje už od osemdesiatych rokov 20. storočia. Najľubnejšie markery pre predikciu veku sú biomarkery, ktoré sú založené na metylácii DNA. Tieto biomarkery majú mnoho výhod, medzi ktoré patrí najmä to, že sa vzťahujú na všetky zdroje DNA a na celé vekové spektrum. Na presné predpovedanie veku jedincov možno použiť metylačné značky na DNA získanej z rôznych telesných tkanív.¹⁰

Metylácia DNA má dedičný účinok s akceleráciou veku a v embryonálnom štádiu jedinca sa blíži k nule. Akcelerácia veku začína vysokým stupňom korelácie v metylačných značkách genómovej DNA v širokom spektre ľudských tkanív a buniek a je ovplyvnená pohlavím, genetickou výbavou, ako aj životným štýlom jedinca. Ľudské genómové oblasti boli identifikované pomocou metylačných vzorov DNA citlivých na vek, čo pomáha pri určovaní biologického veku s maximálnou odchýlkou 5 rokov.

Identifikácia tkaniva a telesnej tekutiny

Spolu so štandardným profilovaním DNA môžu poznatky o type buniek alebo tkanív v stope z miesta činu poskytnúť kľúčové informácie pre rekonštrukciu miesta činu. Niektoré z 5mC metylačných značiek v DNA sú vysoko tkanivovo špecifické a možno ich použiť na rozlíšenie pôvodu vzorky DNA či už z jedného zdroja alebo z viacerých zdrojov. Znamená to, že keď sa DNA získa zo zmesi telesnej tekutiny, táto technika ju dokáže rozlíšiť, čiže určiť, či sa jedná o spermium, sliny, krv alebo akékoľvek iné telesné tkanivá podľa metylačného vzoru, čo možno považovať za serológiu novej generácie. Na potvrdenie vyššie uvedeného bolo doposiaľ vykonaných mnoho štúdií, ktorých predmetom skúmania boli rôzne telesné tekutiny a tkanivá a ich následné rozlišovanie pomocou využitia rôznych druhov analýzy metylácie DNA. Keďže epigenetika sa podieľa na bunkovej diferenciácii a regulácii génovej expresie, identifikácia forenzne relevantných telesných tekutín je možná pomocou diferenciálne metylovaných lokusov. V súčasnosti existuje jediný komerčný test založený na metylácii DNA pre semennú tekutinu. Frumkin a kol. zdôraznili potenciál epigenetických markerov na stanovenie stôp spermy.

Spoľahlivé epigenetické stanovenie zložitejších telesných tekutín, ako je menštruačná krv, môže byť náročnejšie, najmä kvôli kombinácii rôznych typov buniek a menším metylačným účinkom. Nedávno boli vyvinuté nekomerčné multiplexné testovacie systémy zamerané na určovanie niekoľkých tkanív, neboli však ešte úplne zavedené celosvetovo do praxe. Niektoré krajiny tieto systémy v súčasnosti využívajú v rámci vyšetrovania trestnej činnosti. K týmto krajinám patrí napríklad Južná Kórea.¹¹

Rozlišovanie jednovaječných dvojčiat

Monozygotné dvojčatá nemožno individuálne identifikovať štandardnou forenznou analýzou DNA, pretože zdieľajú rovnaký profil DNA, čo je nevýhodou pre orgány činné v trestnom konaní, keďže ich DNA sa zhoduje v celom genóme, ktorý zdedia, a to bráni ich identifikácii pomocou konvenčného profilovania STR, SNP alebo mtDNA. Zistilo sa však, že medzi monozygotnými dvojčatami existuje značná odchýlka vo vzorci metylácie DNA, ktorá je do značnej miery výsledkom nielen genetickej línie, ale i postnatálnych podmienok prostredia. Kvôli tomuto epigenetickému, DNA metylačnému rozdielu medzi monozygotnými dvojčatami, sa u týchto monozygotných dvojčiat vyskytujú odchýlky s výrazným rozdielom v náchylnosti na rôzne choroby. Pre mužské a ženské páry existujú výrazné rozdiely v úrovni metylácie CpG ostrovov, ktoré sú prítomné na autozomálnej alebo X-chromozomálnej DNA.

¹⁰ HORVATH, S., a K. RAJ, 2018. *DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing*. In: *Nature Reviews Genetics*, s. 371–384.

¹¹ FRUMKIN, D., WASSERSTORMM, A., BUDOWLE, B. a kol. 2011. *DNA methylation-based forensic tissue identification*. In: *Forensic Science International: Genetics*, s.517–524.

Tieto rozdiely vo vzore 5mC možno identifikovať pomocou ultrahlbokého MPS, ktoré opísali Weber-Lehmann a kol. ako návrh riešenia prípadov otcovstva a forenzných prípadov týkajúcich sa monozygotných dvojčiat. Okrem sekvenovania možno experiment vykonať pomocou bisulfitovo konvertovanej/PCR amplifikovanej DNA od oboch dvojčiat, keď jedna zo sekvencií DNA dvojčiat s väčším počtom metylových skupín bude vykazovať inú teplotu topenia.¹²

Fajčenie, požívanie alkoholických nápojov a omamných a psychotropných látok

Napriek tomu, že fajčenie je všeobecne tolerované, je preukázané, že má negatívne dôsledky na zdravie, no napriek tomu veľká časť svetovej populácie stále fajčí, napríklad 19 – 32 % Európanov. Schopnosť predpovedať fajčiarske návyky z DNA by bola vysoko informatívna pri charakterizácii neznámej osoby. Je známe, že fajčenie spôsobuje poškodenie DNA a skracovanie telomér, ako aj epigenetické zmeny, ktoré sú spôsobené účinkami na expresiu DNA metyltransferázy. Epigenetické účinky fajčenia tabaku súvisia aj s kumulatívnou expozíciou dymu a s časom od ukončenia fajčenia. Prvá epigenómová celoplošná asociačná štúdia (EWAS) krvi bola zameraná na identifikáciu diferenciálnej metylácie DNA spojenej s fajčením, kde sa našiel jediný CpG marker. Po viac ako 18 ďalších EWAS u tisícok jedincov boli vo viacerých génoch rozpoznané rôzne CpG súvisiace s fajčením. Pozorované rozdiely v metylácii DNA na mieste sú však relatívne malé (zvyčajne menej ako 20 %). Zatiaľ čo väčšina štúdií bola vykonaná v krvi, CpG súvisiace s fajčením boli identifikované aj v iných tkanivách, ako sú pľúca. Zatiaľ čo epigenetické účinky pretrvávajú dlhú dobu po ukončení fajčenia, niektoré sú reverzibilné. Jeden predbežný pokus predpovedať fajčiarske návyky pomocou epigenetiky testoval model kombinujúci štyri CpG na schopnosť rozlíšiť medzi nefajčiarom ($n = 120$) a bývalými fajčiarimi ($n = 45$), pričom sa dosiahla presnosť predikcie plochy pod krivkou 0,83. Hodnoty sa pohybujú medzi 0,5, čo znamená náhodnú predpoveď a 1,0, čo znamená úplne presnú predpoveď. Jedným z dôležitých aspektov je vplyv fajčenia matiek počas tehotenstva, napríklad 10,7 % tehotných amerických matiek fajčilo, čo by mohlo spôsobiť podobné epigenetické zmeny u potomkov, ktoré by trvali do puberty a dokonca aj do dospelosti. Vplyv pasívneho fajčenia, ktoré by mohlo mať vplyv aj na epigenóm, je potrebné zvážiť aj v budúcich praktických aplikáciách epigenetiky na predikciu fajčenia.

Prijem alkoholu sa medzi jednotlivými krajinami a jednotlivcami veľmi líši a predpovedanie návykov pitia alkoholu môže byť užitočné na účely vyšetrovania. Forenzné toxikologické testy na detekciu metabolitov alkoholu existujú pre krv, moč a vlasy, ale neumožňujú usudzovať o pravidelnom pití alkoholu, t. j. ako často a koľko alkoholu sa konzumuje. V dôsledku genetických a environmentálnych faktorov je rozdielna metylácia DNA evidentná u pravidelných konzumentov alkoholu v porovnaní s nepijúcimi. Významné zvýšenie globálnej metylácie krvi bolo pozorované u chronických alkoholikov. Ukázalo sa, že aj gény, napríklad je transportér dopamínu, sa rozdielne metylujú u jedincov závislých od alkoholu. Prvý EWAS pre závislosť od alkoholu odhalil početné epigenetické markery spojené s metabolizmom alkoholu, z ktorých väčšina (1702 CpG, $p < 0,005$) bola hypometylovaná u alkoholikov v porovnaní s nepijúcimi (<17 % rozdiel). V inej štúdií bolo identifikovaných 865 hypometylovaných a 716 hypermetylovaných CpG. V najväčšej dostupnej metaanalýze bolo zvýraznených päť CpG, ktoré vysvetľujú podstatnú časť (5,2–15 %) interindividuálnej odchýlky v spotrebe alkoholu, a preto boli navrhnuté ako biomarkery pre ťažké pitie alkoholu. Epigenetické znaky závislosti od alkoholu sú čiastočne reverzibilné po abstinencii a rovnako ako pri fajčení, prenatálny príjem alkoholu matkou, ktorý sa vyskytuje u 9,8 % tehotenstiev na celom svete, mení génovo špecifickú metyláciu v placentárnej pupočníkovej krvi, a to by mohlo potenciálne viesť k falošne pozitívnym predpovediam. Očakávame, že budúci výskum

¹² STEWART, L. EVANS, N. BEXON, KJ. a kol., 2015. *Differentiating between monozygotic twins through DNA methylation-specific highresolution melt curve analysis*. In: *Anal Biochem*, s. 36-39.

identifikuje robustné markery. Tieto metylačné značky DNA spojené s fajčením nesú riziko rôznych druhov rakoviny vrátane rakoviny krvi, prsníka, hrubého čreva a pľúc a prenášajú sa z jednej generácie na druhú ako epigenetická pamäť.¹³

Užívanie nelegálnych drog prevláda u dospelých v rozmedzí od 1 do 41 % v závislosti od krajiny, a preto je relevantné pri charakterizácii neznámych stopových darcov. Medzi bežne používané drogy patrí kanabis, kokaín a amfetamíny. V závislosti od právneho rámca krajiny dochádza ročne k tisíckam trestných činov súvisiacich s drogami. Väčšina štúdií o epigenetických zmenách vyvolaných liekmi sa uskutočnila na zvieracích modeloch so zameraním najmä na štruktúru chromatinu a modifikácie histónov. Drogami vyvolané zmeny metylácie DNA boli nedávno skúmané v oblastiach mozgu zvierat a nervových bunkách. Aplikovaním kandidátskych génových prístupov boli doteraz v krvi študované iba epigenetické účinky kanabisu a opioidov. Jedinci závislí od kanabisu preukázali zmenenú metyláciu CB1 v krvi, čo je zistené aj u fajčiarov cigariet. Takmer 200 závislých od heroínu vykazovalo zmenenú metyláciu OPRM1 v krvi, ale zmeny na mieste boli malé (<4 %) a vykazovali rozdiely v populácii. Tieto zatiaľ malé rozdiely v metylácii naznačujú, že do asociačných štúdií je potrebné zahrnúť väčší počet jednotlivcov. Vzhľadom na očakávané ťažkosti pri vykonávaní takýchto štúdií s kontrolovaným užívaním drog účastníkmi štúdie však táto výskumná otázka zostáva v počiatočnom štádiu. Budúce experimenty je potrebné zamerať aj na zistenie, či sa epigenetické rozdiely prejavujú iba v mozgu; kde sa prejavujú účinky drogy, alebo či sú tieto detekovateľné aj vo forenzne relevantnejšom tkanive, ako je krv. Okrem toho je potrebné výskum zamerať i na účinky metylácie v súvislosti s požívaným množstvom a reverzibilné účinky.¹⁴

Predikcia veľkosti a tvaru tela jedinca

Zatiaľ čo predpovedanie kategorických externe viditeľných charakteristík, ako je farba očí a vlasov, je už zavedené a využíva sa, predpovedanie prvkov založených na rozmeroch je značne náročnejšie. Pribúdajú dôkazy, že epigenetická variácia môže hrať úlohu pri formovaní telesnej výšky a BMI. V prvej štúdií na ľuďoch sa zistilo, že 83 % génov spojených s výškou obsahuje promótorové CpG ostrovy spojené s génovou reguláciou, z ktorých polovica mala významné moduly hypermetylácie DNA. Na každé zvýšenie metylácie cg22891070 o 10 % u detí bol BMI približne o 3 % vyšší. Tieto účinky sa však neopakovali u adolescentov. Po komplexnom skenovaní približne štyroch miliónov CpG boli objavené štyri variabilne metylované oblasti spojené s BMI (PM20D1, MMP9, PRKG1 a RFC5). V doteraz najväčšej metaanalýze boli hladiny metylácie DNA spojené s BMI pre 187 lokusov úspešne replikované vo viacerých tkanivách a etnických skupinách. V ďalšej štúdií na CD4+ T bunkách bolo identifikovaných osem ďalších CpG súvisiacich s BMI a obvodom pásu. V súčasnosti identifikované CpG spolu s budúcimi výsledkami z rozsiahlych epigenetických štúdií budú tvoriť vhodný súbor markerov pre budúce forenzné využitie na predpovedanie telesnej výšky a hmotnosti osoby, čo v kombinácii s informáciami o fyzickej aktivite môže vytvoriť podrobnejší obraz o postave neznámeho jedinca.¹⁵

Predpovedanie stravovacích návykov jedinca

Predpovedanie stravovacích návykov neznámeho jedinca môže mať forenzný význam v tom prípade, že dodržiava špeciálne diéty, napríklad vegetariánsku alebo konzumuje špecifické potraviny, ktoré môžu byť potenciálne spojené s určitou charakteristikou, ako je

¹³ AZZI, S., SAS, TC. KOUDOU, Y. a kol., 2014. *Degree of methylation of ZAC1 (PLAGL1) is associated with prenatal and post-natal growth in healthy infants of the EDEN mother child cohort.* In: *Epigenetics*, s. 338–345.

¹⁴ RENTHAL, W. a EJ. NESTLER, 2008. *Epigenetic mechanisms in drug addiction.* In: *Trends Molecular Medicine*, s. 341–350.

¹⁵ LOCKE, A.E., KAHALI, B. BEMDZ, S.I. a kol, 2006. *Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology.* In: *Nature*, s.197–206.

geografická poloha, tradícia a náboženstvo. Jednotlivé základné potraviny ako ovocie, zelenina, mäso či ryby obsahujú rôzne hlavné zložky. Rozdiely v stravovaní sa nakoniec premietnu do odlišného príjmu makro a mikroživín vrátane sacharidov, bielkovín, tukov, vitamínov a minerálov. Nutričná epigenomika je relatívne nová, ale rýchlo rastúca oblasť výskumu. Mikroživiny vrátane folátu, teda kyseliny listovej a vitamínov B, zohrávajú kľúčovú úlohu ako sekundárne donory metylov. Jedna z prvých epigenómových štúdií preukázala, že prenatálna expozícia hladu spôsobuje celoživotné metylačné zmeny. Medzigeneračná štúdia identifikovala 134 oblastí „citlivých na výživu“ v súvislosti s poruchami pozornosti a poznania. Pri porovnaní rôznych stravovacích návykov bolo zistené, že európski vegetariáni majú približne o 40 % zníženú bunkovú metyláciu MmSOD v porovnaní s jedincami, ktorí konzumujú mäso, zatiaľ čo v štúdiu hladiny homocysteínu v plazme ukázali významnú koreláciu s globálnou metyláciou DNA v krvi u vegetariánov. Ak sa pozrieme na špecifické makroživiny, expozícia ortuti prostredníctvom konzumácie rýb spôsobuje hypometyláciu SEPP1 a denný príjem pečeného mäsa mení metyláciu p16 v bunkách tkaniva pažeráka. Diétny folát z obohatených potravín bol tiež pozitívne spojený s metyláciou krvi LINE-1. Celkovo diéta zahŕňa zložité, premenlivé vzorce a procesy. Nie je známe, či existujú vzájomné vzťahy medzi rôznymi makro- a mikroživinami a aké jedinečné sú pozorované epigenetické účinky pre konkrétny typ potraviny alebo živiny. Napriek tomu si predstavujeme, že budúca rozsiahla epigenetická analýza rôznych skupín stravovania, ako sú vegetariáni verzus nevegetariáni, môže umožniť zostavenie predikčných modelov, ktoré majú potenciál na použitie vo forenzných aplikáciách.¹⁶

Predikcia fyzickej aktivity jedinca

Informácie o úrovniach fyzickej aktivity osoby nezistenej totožnosti môžu poskytnúť pohľad na jej telesnú štruktúru a vzhľad, čo je relevantné pri opise neznámeho jedinca, ktorý stopu zanechal. Fyzická aktivita ovplyvňuje epigenóm a reguluje génovú expresiu. Je tiež zapojená do interakcií medzi génom a prostredím, ktoré znižujú genetické účinky na index telesnej hmotnosti jednotlivcov. Zatiaľ čo prierezové štúdie a štúdie prípadovej kontroly neodhalili žiadnu významnú koreláciu medzi fyzickou aktivitou a globálnou metyláciou krvi, metylácia génu LINE-1 bola zvýšená u žien, ktoré si dlhodobo udržiavali vyššiu fyzickú aktivitu. Epigenetické účinky súvisiace s cvičením boli tiež významnejšie u starších členov populácie, chorých jedincov (L3MBTL1) a v tkanivách, ako je tuk (TCF7L2) a kostrové tkanivo (KCNQ1). Fyzická aktivita a pravidelné cvičenie koreluje s nižšou metyláciou rakovinových génov v slinách. Pri testovaní účinkov pravidelného mierneho cvičenia na zápalovú odpoveď prostredníctvom epigenetických zmien v krvi sa nezistil žiadny účinok týkajúci sa génov IL-6 a p15, ale pozorovala sa znížená metylácia krvi ASC závislá od veku. Doteraz boli študované účinky dlhodobého a nie nárazového cvičenia, takže nie je známe, kedy sa metylačné zmeny prejavujú a stanú sa zistiteľnými vo vzťahu k trvaniu pravidelného cvičenia. Tento výskum je stále v počiatočnom štádiu a prebieha, ale budúce rozsiahle experimenty vrátane režimov kontrolovaného cvičenia pre účastníkov štúdie majú potenciál identifikovať odlišné epigenetické rozdiely súvisiace s cvičením. V závislosti od výsledkov môže byť vyvinutý forenzný nástroj na predpovedanie či je neznámy stopový darca fyzicky aktívny alebo nie.¹⁷

¹⁶ FREIRE-ARADAS, A., PHILLIPS, C., MOSQUERA- MIGUEEL, A. a kol., 2016. *Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the agena bioscience EpiTYPER system.* In: *Forensic Science International: Genetics*, s. 65–74.

¹⁷ ALGHANIM, H., ATUNES, J., SILVA, D.S.B.S. a kol., 2017. *Detection and evaluation of DNA methylation markers found at SCGN and KLF14 loci to estimate human age.* In: *Forensic Science International: Genetics*, s. 81–88.

Možnosti budúceho výskumu

Oblasť epigenetiky sa nedávno stala medzníkom vo výskume forenzných vied, pretože má veľký význam pri identifikácii a analýze forenzných vzoriek. Epigenetické aplikácie vo forenznej oblasti sú relatívne nové a v súčasnosti obmedzené, ale v blízkej budúcnosti očakávame ich rýchly vývoj.

Metylácia DNA, najmä metylácia cytozínu v miestach CpG, je hlavná epigenetická a chemická zmena v DNA, ktorá bez zmeny sekvencie DNA vedie k fenotypovým variáciám medzi rôznymi tkanivami, monozygotnými dvojčatami alebo medzi ľuďmi celkovo. Metylácia DNA poskytla nový pohľad na rozlíšenie bunkových typov alebo tkanív, rozlíšenie jednovaječných dvojčiat, veku ľudí, ľudských rás. Môže sa dokonca používať na predpovedanie dodržiavania určitého typu stravovania či rozmerov tela. Pokrok vo výskume metylácie v budúcnosti môže umožniť prekonať nami prezentované obmedzenia, ktoré sme prezentovali pri možnostiach riešenia rôznych forenzných problémov a poskytnúť dostatok odborných znalostí na zavedenie sofistikovaných molekulárnych techník, a to už vo veľmi blízkej budúcnosti. Začiatok štúdií metylácie DNA vo forenzných vedách je základom pre podporu konvenčného profilovania STR a je zrejmé, že v blízkej budúcnosti môže byť táto technika použitá na vytvorenie nezávislých dôkazov, ako aj podporných dôkazov na detekciu, mapovanie a riešenie celého radu forenzných prípadov. Ďalší výskum považujeme za potrebné zamerať najmä na: katalogizáciu a pochopenie epigenetických znakov životného štýlu a environmentálnych faktorov; identifikáciu epigenetických markerov a vytvorenie a overenie štatistických modelov na presnú epigenetickú predpoveď vplyvu životného štýlu; technický pokrok v simultánnej analýze veľkého počtu epigenetických markerov z DNA nízkej kvality či kvantity, potenciálne prostredníctvom nových technológií a vývoj a forezné overovanie citlivých testov multiplexnej analýzy. Za potrebné považujeme aj vedenie etických a spoločenských diskusií o prínose/rizikách používania takýchto ľudských epigenetických údajov vo forenznej praxi s následnými právnymi implementáciami. Ak sa epigenomická predikcia životného štýlu a faktorov životného prostredia nakoniec použije v praxi, zlepši výskumný potenciál DNA doplnením genetickej predikcie vzhľadu a biogeografického pôvodu a epigenetickej predikcie veku, pričom cieľom je viesť policajné vyšetrowanie smerom k zisťovaniu totožnosti neznámych páchatel'ov trestnej činnosti, ktorí sú neidentifikovateľní štandardným forezným profilovaním DNA.

Záver

Genetika a analýza DNA sú v súčasnosti podporované rýchlym rozvojom nových metód a postupov, s čím úzko súvisí i rozvoj v oblasti epigenetiky. Epigenetika je oblasťou zaoberajúcou sa štúdiom mechanizmov zodpovedných za reguláciu expresie, a teda prejavu génov. Zaoberá sa epigenetickými zmenami, ktoré spočívajú v rozhodovaní, či sa gén prejaví alebo nie, no v tom, kedy sa prejaví, pričom výsledky tohto rozhodovania zohrávajú dôležitú úlohu i vo forenznej oblasti. Medzi epigenetické zmeny patria chemické modifikácie histónov, činnosť malých nekódujúcich molekúl RNA, zmeny v usporiadaní chromatinu a metylácia DNA. Metylácia je javom, pri ktorom dochádza k prenosu metylovej skupiny $-CH_3$ na piaty uhlíkový atóm, v mieste cytozín-fosfát-guanín pyrimidinového kruhu cytozínu pomocou enzýmu z rodiny DNA methyltransferáz- DNMT.

Rozlišovanie jednovaječných dvojčiat, presné predpovedanie veku a predovšetkým interpretácia ľudského správania predstavujú v súčasnosti vo forenznej vede veľké výzvy. Výskum v oblasti metylácie DNA sa zameriava práve na tie forezne relevantné oblasti, ktorými sú odhad veku pôvodcu vzorky DNA, identifikácia typu tkaniva pre telesné tekutiny a iné forezne relevantné biologické vzorky. Zameriava sa aj na možnosti rozlišovania jednovaječných dvojčiat a na iné oblasti, ktoré majú potenciál napomáhať vo vyšetrowaní rôznorodnej trestnej činnosti. Metylácia DNA zohráva kľúčovú úlohu v diferenciácii buniek, a teda miesta cytozín-fosfát-guanín sú v rôznych tkanivách rozdielne metylované. Táto

tkanivová špecifickosť bola úspešne využitá na vývoj testov založených na metylácií, a to za pomoci rôznych technológií. Moderné pokroky v oblasti epigenetiky, t.j. analýza vzoru metylácie DNA, napomáha identifikovať a rozlíšiť rôzne vzorky DNA z jedného zdroja, z čoho vyplýva, že vďaka pokroku v metódach analýzy metylácie DNA spolu so štandardnými epigenetickými protokolmi je perspektíva vyšetovania a riešenia týchto kritických problémov vo forenznej veľmi sľubná.

Literatúra

- ALGHANIM, H., ATUNES, J., SILVA, D.S.B.S. a kol., 2017. Detection and evaluation of DNA methylation markers found at SCGN and KLF14 loci to estimate human age. In: *Forensic Science International: Genetics*, vol. 31, s. 81–88. ISSN 1872-4973.
- AZZI, S. SAS, TC. KOUDOU, Y. a kol., 2014. Degree of methylation of ZAC1 (PLAGL1) is associated with prenatal and post-natal growth in healthy infants of the EDEN mother child cohort. In: *Epigenetics*, vol. 9, n. 3, s. 338–345. ISSN 1559-2294.
- BEKAERT, B. KAMALANDUA, A. ZAPICO, S.C. a kol., 2015. Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. In: *Epigenetics*, vol. 10, n. 10, s. 922–930. ISSN 1559-2294.
- EGGER G., LIANG G., APARICIO A. a kol. 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. In: *Nature*, n. 429, s. 457-461. ISSN 0028-0836.
- FREIRE-ARADAS, A. PHILLIPS, C, MOSQUERA- MIGUEEL, A. a kol., 2016. Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the agena bioscience EpiTYPER system. In: *Forensic Science International: Genetics*, vol. 24, s. 65–74. ISSN 1872-4973.
- FRUMKIN, D. WASSERSTORMM, A. BUDOWLE, B. a kol., 2011. DNA methylation-based forensic tissue identification. In: *Forensic Science International: Genetics*, vol. 5, n. 5, s.517–524. ISSN 1872-4973.
- HORVATH, S. a K. RAJ, 2018. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. In *Nature Reviews Genetics*, vol. 19, s. 371–384. ISSN 1471-0056.
- JIN B., LI Y. a K.D. ROBERTSON, 2011. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? In: *Genes & Cancer*, vol. 2, n. 6, s. 607-617. ISSN 1947-6019.
- LOCKE, A.E. KAHALI, B. BEMDZ, S.I. a kol., 2006. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. In: *Nature*, vol. 518, s.197–206. ISSN 0028-0836.
- NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE, 2023. Deoxyribonucleic acid (DNA). In: *National Human Genome Research Institute*. [online].[cit. 22.05.2023]. Dostupné na internete: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Deoxyribonucleic-Acid>.
- NIH, 2022. Genetics. In: *National institute of General Medical Sciences*. [online]. [cit. 27.01.2023]. Dostupné na internete: <https://nih.gov/education/factsheet/Pages/genetics.aspx>.
- OHGANE, J., YAGI, S. a K. SHIOTA, 2008. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. In: *Placenta*, vol. 22, s. 29-35. ISSN 0143-4004.
- RENTHAL, W. a EJ. NESTLER, 2008. Epigenetic mechanisms in drug addiction. In: *Trends Molecular Medicine*, vol.14, n. 8. s. 341-350. ISSN 1471-499X.
- STEWART, L. EVANS, N. BEXON, KJ, a kol., 2015. Differentiating between monozygotic twins through DNA methylation-specific highresolution melt curve analysis. In: *Anal Biochem*, vol. 476, no. 36, s. 36-39. ISSN 0003-2697.

VIDAKI A. a M. KAYSER, 2017. From forensic epigenetics to forensic epigenomics: broadening DNA investigative intelligence. In: *Genome Biology*, vol. 18, s. 238. ISSN 1474-760.

VND, 2018, Čo je epigentika a aký je vzťah medzi genetikou a epigenetikou. In: *Veda na dosah*. [online]. [cit. 27.01.2023]. Dostupné na internete: <https://vedanadosah.cvtisr.sk/priroda/biologia/co-je-epigenetika-a-aky-je-vztah-medzi-genetikou-a-epigenetikou/>

Keywords: DNA, DNA methylation, epigenetic changes, DNA methylation analysis, forensic use of DNA methylation

Summary

Genetics and DNA analysis is currently supported by the rapid development of new methods and procedures, which is closely related to the development in the field of epigenetics. Epigenetics is a field of study of the mechanisms responsible for the regulation of the expression of genes. It deals with epigenetic changes, which consist in deciding whether a gene will be expressed or not, but also when it will be expressed, while the results of this decision play an important role in the forensic field as well. Epigenetic changes include chemical modifications of histones, activity of small noncoding RNA molecules, changes in chromatin organisation, and DNA methylation. Methylation is a phenomenon in which the methyl group $-CH_3$ is transferred to the fifth carbon atom, in the cytosine-phosphate-guanine site of the pyrimidine ring of cytosine, using an enzyme from the DNA methyltransferase family – DNMT. Distinguishing identical twins, accurately predicting age and, above all, interpreting human behaviour is currently a major challenge in forensic science. Research in the field of DNA methylation focuses precisely on forensically relevant areas, such as the estimation of the age of the DNA sample originator, the identification of the tissue type for body fluids and other forensically relevant biological samples, on the possibilities of distinguishing identical twins and on other areas that have the potential to help in investigation of various criminal offences. DNA methylation plays a key role in cell differentiation; thus cytosine-phosphate-guanine sites are differently methylated in different tissues. This tissue specificity has been successfully used to develop methylation-based assays using various technologies. Modern advances in the field of epigenetics, and thus DNA methylation pattern analysis, help to identify and distinguish different DNA samples from a single source – this implies that with the advancement of DNA methylation analysis methods, along with standard epigenetic protocols, the prospect of investigating and solving these critical issues in forensics is very promising.

*npor. Mgr. Michaela Naháľková
starší referent-poverený príslušník
OO PZ Karlova Ves
Okresné riaditeľstvo PZ v Bratislave IV
e-mail: michaela.nahalkova@minv.sk*

Recenzenti: pplk. doc. RNDr. Soňa Masnicová, PhD., prof. JUDr. Jozef Meteňko, PhD.