

Možnosti molekulárně genetického stanovení věku jednotlivce z biologických stop

Marie Korabečná

Ústav biologie a lékařské genetiky 1. lékařské fakulty UK a Všeobecné fakultní nemocnice, Praha

SOUHRN

Využití molekulárně genetických metod pro analýzu biologických stop je „zlatým standardem“ při individuální identifikaci jejich původců. Bez možnosti porovnat genetický profil stopy s profilem kontrolního vzorku jejího potenciálního původce však tato analýza neposkytuje vodítka pro další směr vyšetřování. Zajímavým údajem pro vyšetřovatele by mohl být například věk původce stopy. V přehledu jsou diskutovány současné metodické možnosti a jejich výstupy směřující k určení tohoto údaje.

Klíčová slova: odhad věku – molekulární genetika – zkracování telomer – qPCR – arrayové technologie – metylace promotoru

Possibilities of molecular genetic determination of age of an individual from biological traces

SUMMARY

Application of molecular genetic methods during the examination of biological traces is irreplaceable for individual identification of their originators. However, this analysis does not provide any clues for further investigation without the possibility to compare the genetic profile of the examined trace with the profile of its potential originator. The age of a searched person represents an important entry for investigators. In this review, the recent methodical molecular genetic approaches are discussed with regards to their practical outputs leading to the estimation of biological age of an individual. The length of telomeric sequences and their attritions correlating with increasing age seemed to be very promising marker if they have been examined using Southern blot analysis. This method is not suitable for forensic casework due to the need of high amounts of DNA input. Recent methods based on quantitative polymerase chain reaction (qPCR) are applicable on samples with minimal DNA concentrations but they provide inconclusive results with regard to the age estimation based on the length of telomeres. Therefore novel methodical approaches were developed. Application of methods based on the examination of deletions in mitochondrial DNA, on the presence of transcripts of gamma hemoglobins or on the quantification of byproducts of somatic rearrangements of genes for T-cell receptors is restricted to special types of biological traces. The age dependent methylation of specific nucleotides in selected gene sequences seems to be the only promising universal marker.

Keywords: age estimation – molecular genetics – telomere attrition – qPCR – array technology – promoter methylation

Soud Lek 2014; 59(4): 52–54

Aplikace molekulárně genetických metod při vyšetřování biologických stop je nezastupitelná s ohledem na individuální identifikaci jednotlivce, který tyto stopy zanechal. Bez možnosti porovnat genetický profil získaný ze stopy s profilem kontrolního vzorku jejího potenciálního původce však molekulárně genetická analýza neposkytuje žádná vodítka pro další směr vyšetřování. Prakticky zajímavým údajem pro vyšetřovatele je například věk původce stopy.

V následujícím přehledu budou rozebrány jednotlivé metodické přístupy a jejich potenciální praktické výstupy směřující k určení věku jednotlivce na základě molekulárně genetického vyšetření biologické stopy, kterou zanechal. Výzkum na tomto poli zatím nevýstítil v žádnou obecně aplikovatelnou metodiku s jednoznačnou interpretací, přesto bylo dosaženo nadějných výsledků,

kteří se po rozpracování a validaci na vzorcích z terénu mohou stát zdrojem cenných údajů pro vyšetřování trestných činů.

PŘEHLED DOSAVADNÍCH METOD A JEJICH VÝSLEDKŮ

Určení délky telomér

Velké naděje byly vkládány do stanovení délky telomer jako nástroje pro odhad věku původce stopy. Telomery jsou sekvence DNA nacházející se na koncích chromozómů, které přítomnost těchto sekvencí chrání před zkracováním v důsledku způsobu fungování replikace DNA v každém buněčném dělení (1). Při narození mají telomery délku 15 až 20 tisíc párů bází, přičemž tato repetitivní sekvence vzniká opakováním základního sekvenčního motivu TTAGGG. Během buněčného dělení v souvislosti s duplikací chromozómů však mechanismus replikace DNA není schopen prostřednictvím DNA polymerázy replikovat konce opožďujících se řetězců, čímž dochází v průběhu stárnutí ke zkracování výše popsaných vysoce repetitivních sekvencí telomer. Konce chromozómů jsou přítomností dostatečného počtu nekódujících repetitivních sekvenčních jednotek takto chráněny před ztrátami kódujících sekvencí. Buňky jsou však

✉ Adresa pro korespondenci:

Doc. RNDr. Marie Korabečná, Ph.D.
Ústav biologie a lékařské genetiky
1. lékařské fakulty UK a VFN Praha
Albertov 4, 128 00 Praha 2
e-mail: marie.korabecna@lf1.cuni.cz
tel: +420 603 177 178

schopny se aktivně bránit zkracování telomer dvěma dosud poznanými mechanismy- prostřednictvím prodlužování telomer za pomoci enzymu telomerázy, který je reverzní transkriptázou, nebo mechanismem využívajícím homologní rekombinace (tzv. mechanismus ALT – *Alternative Lengthening of Telomere*) (1).

Pokusy o nalezení korelace mezi délkou telomer a biologickým věkem jedince přinesly rozporuplné výsledky (2). Ve studii Tsuji et al. (3) byla nalezena korelace mezi délkou telomer a věkem jedince ($R^2 = 0.692$) při vyšetření 60 individuí a aplikaci metody Southern blotu se sondou hybridizující k repetitivní sekvenci telomery. Další studie provedené touto metodou tuto korelaci potvrdily (4,5). Ačkoliv metoda Southern blotu umožňuje zachytit širokou variabilitu délky telomer v rámci jednoho vzorku, její praktické provedení je zdouhavé a vyžaduje větší vstupní množství materiálu, v praxi často nedostupného. Z těchto důvodů došlo k metodickému posunu směrem ke kvantifikaci založené na využití polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qPCR), která je pro forenzní genetiku vhodná zejména tím, že funguje s velmi nízkými vstupními koncentracemi DNA odpovídajícím několika buňkám. Metodiky publikované Cawthonem (6,7) zjišťují poměr mezi množstvím telomerické repetitivní sekvence a sekvence unikátního genu, která je v genomu každé buňky přítomna pouze ve dvou kopiích. Tento poměr odpovídá průměrné délce telomer ve vzorku. Studie takto prováděné však našly nízkou (8) nebo žádnou korelaci (9,10) mezi průměrnou délkou telomer a věkem jedince. Neúspěšné byly rovněž pokusy o nalezení závislosti mezi délkou telomer a věkem jedince pomocí modifikace qPCR metody pracující s TaqMan technologií či pomocí metody STELA (*Single Telomere Length Analysis*) zaměřené selektivně na určení délky telomer pohlavních chromozómů (2).

Další studie prokázaly za využití metody Southern blotu rozdílnou délku telomer a rychlost jejich zkracování v různých tkáňích včetně individuální specifity těchto parametrů (10,11).

Zajímavé výsledky přineslo studium délky telomer u spermií, kde bylo metodou Southern blotu prokázáno, že spermie starších mužů (nad 50 let) nesou delší telomery než spermie mužů mladých (pod 30 let) (12). S tímto faktem koresponduje skutečnost, že u potomků starších mužů byly nalezeny delší telomery u novorozenců (13). Další osud telomer novorozence však kromě jeho pohlaví - u žen je zkracování pomalejší (4) - záleží na celé řadě fyziologických (fungování regulačních drah) i patologických (např. oxidativní stres) faktorech různě se projevujících v závislosti na typu tkáně (2).

Ačkoliv délka telomer a její zkracování v závislosti na stou-
pajícím věku byla s ohledem na možnosti určení stáří jedince z biologické stopy ve forenzní genetice poměrně intenzivně zkoumána, recentní poznatky naznačují, že vzhledem ke komplexnosti celého fenoménu, bude potřeba hledat vhodné molekulární markery k určení věku genetickou analýzou v jiných oblastech genomu, eventuelně transkriptomu či metylomu.

Detekce delece v mitochondriální DNA

Vzhledem k abundanci mitochondrií v buňkách a množství cirkulárních mitochondriálních DNA (mtDNA) v každé z nich by nalezení markeru vhodného k určení věku jedince na úrovni analýzy mtDNA bylo pro forenzní genetiku velkým přínosem umožňujícím zkoumat i stopy obsahující limitní množství genetického materiálu. V průběhu oxidativní fosforylace v mitochondriích se až 0,2% kyslíku uvolňuje ve formě volných radikálů poškozujících v matrix mitochondrie přítomné molekuly mtDNA. Kvantifikace molekul mtDNA nesoucích deleci o rozsahu 4977 bp metodou qPCR se jevila v tomto ohledu jako velmi nadějný marker (14), další studie autorského týmu však našly korelaci jen u tkání, které se běžně nevyskytují jako biologické stopy (svalstvo, mozková tkáň). V buňkách periferní krve nebyla nale-

zena korelace mezi zvýšeným výskytem této delece v mtDNA a vyšším věkem jedince (14).

Průkaz transkriptů gamma hemoglobinů

Metoda založená na průkazu přítomnosti transkriptů genů pro gamma hemoglobiny (HBG1n1, HBG1n2, HBG2n2 a HBG2n3) slouží k průkazu krve novorozence ve věku do 4 měsíců (15). Metoda založená na průkazu transkriptů specifických genů sice zároveň umožňuje určit charakter vzorku (tj. odlišit krev novorozence od krve staršího jedince či menstruační krve), má však velmi omezené spektrum praktického využití.

Detekce produktů somatické rekombinace odehrávající se v T-lymfocytech

Metoda vykazující velmi dobrou korelaci s věkem jedince ($R^2 = 0,835$) je založena na detekci cirkulárních produktů somatické rekombinace probíhající v T-buňkách při somatických přestavbách v genech pro receptory T-buněk (TCR). Se vzrůstajícím věkem se snižuje frekvence těchto přestaveb a tím i frekvence jejich vedlejších cirkulárních produktů vzniklých excizí (sjTRECs - *signal joint TCR Excision Circles*), které je možné kvantifikovat metodou qPCR ve spojení s TaqMan technologií (16).

Elegantní metoda je dostatečně senzitivní, postačuje 5 ng vstupní DNA. Predikční model založený na této metodě funguje uspokojivě - s AUC (*Area Under Curve*) až 0.97. Hlavní nevýhodou tohoto přístupu však zůstává jeho omezení na biologické vzorky obsahující T-buňky, tudíž jej není možné aplikovat na stopy epiteliálního původu nebo sperma. Další faktory (etnicita, fyziologické a patologické stavy) zatím nebyly ve vztahu k tomuto metodickému přístupu určení věku původce stopy zkoumány.

Stanovení stupně metylace specifických promotorů

V průběhu diferenciací tkání i stárnutí dochází rovněž ke změnám epigenetickým, značná pozornost je věnována v tomto ohledu zejména metylaci DNA. Metylací DNA je do značné míry ovlivňována aktivita genových promotorů, přičemž vyšší stupeň metylace je zpravidla spojován s transkripčním umlčením dotyčného genu.

Nové přístupy založené na arrayových technologiích dovolují vyšetření obrovského počtu sekvencí v jednom experimentu. Například Illumina Human Methylation Microarray poskytne výsledek informující o metylaci 27 578 CpG dinukleotidů umístěných celkem ve více než 14 000 lidských genech. Tato technologie byla aplikována s cílem nalezení specifického metylačního vzoru korelujícího s věkem jedince napříč různými tkáněmi. Bocklandt et al. (17) se zaměřil na studium 34 párů jednovaječných dvojčat, která jsou vzhledem ke své genetické (a v okamžiku narození i epigenetické) identitě pro tento typ výzkumu obzvláště vhodná. Věk dvojčat se pohyboval mezi 21 a 55 lety, zkoumány byly vzorky jejich slin. Ukázalo se, že s postupujícím věkem dobře korelují změny metylace v genech *EDARADD*, *TOMA1L1* a *NPTX2*. Byl vytvořen regresní model se schopností predikovat věk jedince s přesností 5,2 roku.

Nejen na výše uvedenou studii navázala práce německých autorů (18) hledající tzv. „Epigenetic-Aging-Signature“ použitelný k predikci věku nezávisle na typu zkoumané tkáně. Tento epigenetický podpis související s věkem jednotlivce se skutečně při porovnávání různých typů tkání včetně forenzně relevantních podařilo najít - obsahuje 5 CpG dinukleotidů lokalizovaných v genech *NPTX2*, *TRIM58*, *GRIA 2*, *KCNQ1DN* a *BIRC4BP*. Model založený pouze na třech diferencielně metylovaných pozicích v genech *KCNQ1DN*, *NPTX2* a *GRIA2* vedl k průměrné přesnosti při odhadu věku $\pm 11,4$ roku ($R^2 = 0.74$). Hlavní předností této

studie je ověření fungování vybraného setu markerů na širším spektru buněk a tkání (včetně buklálních i cervikálních stěrů a buněk periferní krve).

Obě citované studie našly s věkem korelující změny metylace v genu *NPTX2* (Neuronal Pentraxin II), jehož zvýšená exprese byla popsána u Parkinsonovy choroby a nádoru slinivky (17).

ZÁVĚR

Navzdory výše popsanému soustředěnému úsilí nelze konstatovat, že by byla etablována obecně akceptovatelná metoda dovolující na základě molekulárně genetické analýzy určení biologického věku původce biologického vzorku. Metodické přístupy založené na determinaci délky telomer nelze do budoucna jednoznačně zahrnout (za použití metody Southern blotu byly nacházeny povzbudivé korelace mezi délkou telomer a věkem jedince). Současné metody založené na qPCR jsou sice dostatečně citlivé, ale stanovují pouze průměrnou délku telomer ve zkoumaném vzorku. Naději lze proto vkládat do metodického zlepšení na tomto poli a do výzkumu chování telomer jednotlivých chromozómů.

Metodické přístupy vzešlé z široce pojatých studií metylace genů založených na nových technologiích se zdají být v současnosti velmi perspektivní především s ohledem na svůj potenciál fungovat napříč širokým spektrem biologických vzorků.

Před praktickou aplikací kterékoliv z popsaných metod je však potřeba studovat soubory vzorků o statisticky relevantní velikosti k vyloučení jak vlivů vnějšího prostředí, tak i fyziologických či patologických faktorů na kvalitu vzorku a možnosti interpretace nálezu.

Důležitým aspektem komplikujícím predikci věku původce biologické stopy jako orientačního údaje pro vyšetřovatele může být i diskrepance mezi biologickým a chronologickým věkem jedince. Laboratorní metoda vedoucí k věrohodnému důkazu takovéto diskrepance by však mohla najít uplatnění i v preventivní medicíně.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla podpořena projektem PRVOUK P25/LF1/2 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR, projektem RVO VFN 64165 Ministerstva zdravotnictví ČR a projektem TIP FR TI1/328 Ministerstva průmyslu a obchodu ČR.

REFERENCES

1. Zhao Z, Pan X, Liu L, Liu N. Telomere Length Maintenance, Shortening, and Lengthening. *J Cell Physiol* 2014; 229(10): 1323-9.
2. Saeed M, Berlin RM, Cruz TD. Exploring the utility of genetic markers for predicting biological age. *Leg Med (Tokyo)* 2012; 14(6): 279-285.
3. Tsuji A, Ishiko A, Takasaki T, Ikeda N. Estimating age of humans based on telomere shortening. *Forensic Sci Int* 2002; 126(3): 197-199.
4. Ren F, Li C, Xi H, Wen Y, Huang K. Estimation of human age according to telomere shortening in peripheral blood leukocytes of Tibetan. *Am J Forensic Med Pathol* 2009; 30(3): 252-255.
5. Takasaki T, Tsuji A, Ikeda N, Ohishi M. Age estimation in dental pulp DNA based on human telomere shortening. *Int J Legal Med* 2003; 117(4): 232-234.
6. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1-6.
7. Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(3): e21.
8. Karlsson AO, Svensson A, Marklund A, Holmlund G. Estimating human age in forensic samples by analysis of telomere repeats. *Forensic Sci Int Genetics Suppl* 2008; 1(1): 569-571.
9. Hewakapuge S, Van Oorschot R, Lewandowski P, Baindur-Hudson S. Investigation of telomere lengths measurement by quantitative real-time PCR to predict age. *Leg Med* 2008; 10(5): 236-242.
10. Takubo K, Izumiyama-Shimomura N, Honma N, et al. Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Exp Gerontol* 2002; 37(4): 523-531.
11. Nordfjall K, Svensson U, Norrback KF, Adolfsson R, Lenner P, Roos G. The individual blood cell telomere attrition rate is telomere length dependent. *PLoS Genet* 2009; 5(2): e1000375.
12. Kimura M, Cherkas LF, Kato BS, et al. Offspring's leukocyte telomere length, paternal age, and telomere elongation in sperm. *PLoS Genet* 2008; 4(2): e37.
13. Unryn BM, Cook LS, Raibowol KT. Paternal age is positively linked to telomere length of children. *Aging Cell* 2005; 4(2): 97-101.
14. Meissner C, Ritz-Timme S. Molecular pathology and age estimation. *Forensic Sci Int* 2010; 203(1-3): 34-43.
15. Alvarez M, Ballantyne J. The identification of newborn using messenger RNA profiling analysis. *Anal Biochem* 2006; 357(1): 21-34.
16. Zubakov D, Liu F, van Zelm MC, et al. Estimating human age from T-cell DNA rearrangements. *Curr Biol* 2010; 20(22): R970-R971.
17. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, et al. Epigenetic predictor of age. *PLoS One* 2011; 6(6): e14821.
18. Koch CM, Wagner W. Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. *Aging (Albany NY)* 2011; 3(10): 1018-1027.

